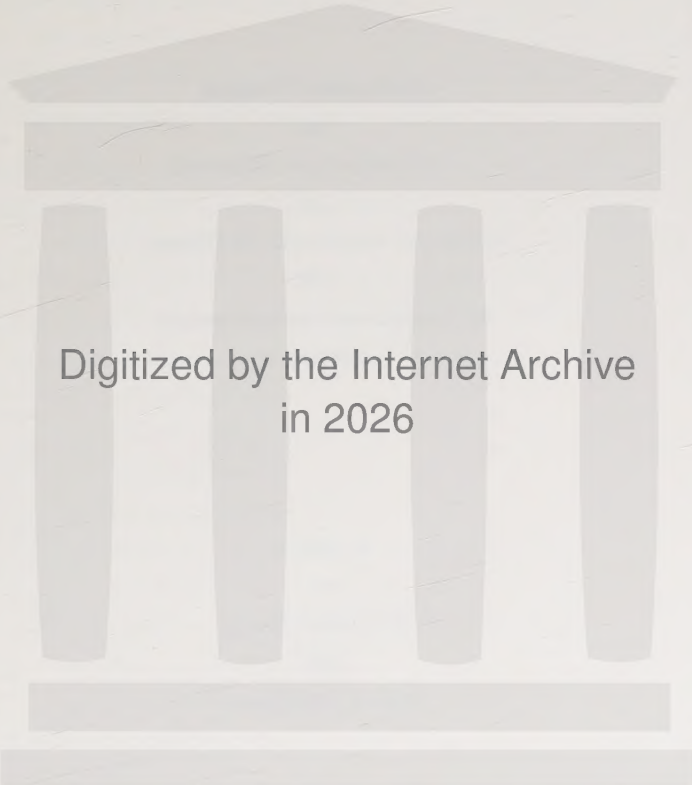


**Zur Chemie der Harzglykoside
von *Convolvulus microphyllus*,
Ipomoea Quamoclit und
*Ipomoea orizabensis***

Gerald Schwarting

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0059

Zur Chemie der Harzglykoside von *Convolvulus microphyllus*,

Ipomoea Quamoclit und *Ipomoea orizabensis*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Gerald Schwarting

aus

Connecticut U.S.A.

April 1974



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1974

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
A. Bisherige Arbeiten zur Strukturaufklärung der	
Glykosidsäuren aus Convolvulus-Arten	2
I. Chemosystematik	2
II. Bisherige Isolierungs- und Aufbereitungsverfahren . . .	5
III. Bisherige strukturell aufgeklärte Glykosidsäuren . . .	9
B. Isolierung und Strukturaufklärung von Microphyllinsäure aus	
Convolvulus microphyllus Sieb ex. Spreng	14
I. Darstellung des Roh-Glykolipids	14
II. Alkalische Hydrolyse und Isolierung der Glykosidsäure .	15
III. Saure Hydrolyse und Identifizierung der Spaltprodukte .	19
1. Qualitative und quantitative Fettsäureanalyse	19
a. Chromatographie	19
b. Infrarot-Spektroskopie	21
c. NMR-Spektroskopie	22
d. Massenspektrometrie	23
e. Bestimmung des Fettsäure-Saccharid- Verhältnisses	26
2. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	27
a. Chromatographie	27
b. Spektralphotometrische Zuckeranalyse	31
IV. Partielle Hydrolyse	32
V. Acetolyse	34
VI. Permethylierung	38
C. Isolierung und Beiträge zur Struktur einer neuen Glykosid- säure aus Ipomoea Quamoclit L.	
	45
D. Isolierung und Strukturaufklärung einer Glykosidsäure aus	
Ipomoea orizabensis Ledanois	51
Zusammenfassung	55

	Seite
EXPERIMENTELLER TEIL	57
A. Allgemeine Arbeitsmethoden	57
I. Dünnschichtchromatographie	57
1. Adsorbens	57
2. Laufmittel	57
3. Sprühreagentien	58
II. Präparative Dünnschichtchromatographie	58
III. Säulenchromatographie	59
IV. Papierchromatographie	59
1. Laufmittel	59
2. Sprühmittel	59
V. Präparative Papierchromatographie	59
VI. Gaschromatographie	60
VII. Präparative Gaschromatographie	61
B. Physikalisch-chemische Untersuchungen	61
C. Gewinnung der Glykosidsäure	63
I. Extraktion	63
II. Alkalische Hydrolyse	63
III. Acetylierung	64
IV. Isolierung des Glykosidsäuremethylesters	64
V. Isolierung des Glykosidsäureacetats	64
VI. Entacetylierung	65
D. Strukturaufklärung der Microphyllinsäure	65
I. Saure Hydrolyse	65
II. Darstellung der Fettsäuremethylester	66
III. Quantitative Bestimmung der Zucker der Microphyllinsäure	67
IV. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker	68
V. Partielle Hydrolyse.	70
VI. Acetolyse	70
VII. Perjodat-Oxidation	71
VIII. Permethylierung	71
IX. Hydrolyse der Metzylzucker	72
X. Darstellung des Methylzuckeraltitolacetats	72

E. Beiträge zur Struktur einer Glykosidsäure aus Ipomoea	
Quamoclit L. (Quamoclitsäure)	73
I. Extraktion	73
II. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker	74
F. Versuche zur Strukturaufklärung einer Glykosidsäure aus	
Ipomoea orizabensis (Orizabinsäure B)	75
I. Extraktion	75
II. Isolierung	76
III. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker	77

EINLEITUNG

Die früher als Laxativa viel verwendeten Glykosidharze der Convolvulaceen-Familie sind wegen ihrer komplexen chemischen Strukturen lange Zeit wenig bearbeitet worden. Obwohl die genuinen Glykosidharze, Acylglykoside langkettiger Hydroxyfettsäuren mit Molekulargewichten zwischen 1000 und 20000 auch heute noch in ihren genauen Strukturen unbekannt sind, ist es im Arbeitskreis von Kawasaki (Japan) und dem unsrigen in den letzten Jahren gelungen, einige der niedermolekularen Glykosidsäuren, die man aus den Glykosidharzen durch Alkalihydrolyse erhalten kann, rein zu isolieren und strukturell aufzuklären. Bei diesen Glykosidsäuren handelt es sich um Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta- oder Hexa-Glykoside langkettiger Mono- oder Di-hydroxyfettsäuren. Aufgeklärt wurden bisher die Glykosidsäuren von *Ipomoea muricata* Jacq., *Ipomoea purga* Hayne und *Ipomoea operculata* Martin sowie *Pharbitis Nil* Choisy.

Die vorliegende Arbeit setzt diese Arbeiten fort und beschäftigt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung der Glykosidsäuren von *Convolvulus microphyllus* Sieb ex. Spreng., *Ipomoea Quamoclit* L. und *Ipomoea orizabensis* (Pellet) Ledanois.

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisherige Arbeiten zur Strukturaufklärung der Harzglykoside aus der Convolvulaceen-Familie

I. Chemosystematik

Zur Familie der Convolvulaceen gehören etwa 1100 Arten mit annähernd 45 Gattungen¹⁾. Die bekanntesten sind: Convolvulus, Ipomoea, Merremia, Operculina, Quamoclit, Pharbitis, Argyreia, Rivea, Evolvulus und Cuscuta.

Bisher wurden in der Convolvulaceen-Familie zwei verschiedene Alkaloid-Typen, Tropeinverbindungen und Lysergsäurederivate, gefunden. Flavonoide und Cumarine scheinen ebenfalls in der Familie weit verbreitet. Der Gehalt an ätherischen Ölen ist sehr gering. Zu den wichtigsten und chemotaxonomisch interessantesten Inhaltsstoffen gehören jedoch die laxierend wirkenden Glykosidharze (Glykoretine).

Die Glykosidharze besitzen eine sehr komplexe Natur und bestehen aus niedermolekularen Hydroxyfettsäureglykosiden, die untereinander zu höhermolekularen Verbindungen verknüpft sind. Die Zuckerhydroxyle sind in vielen Fällen mit kurzkettigen Fettsäuren verestert. Für die Glykosidharze, auch Glykoretine genannt, wurde von Mannich und Schumann²⁾ folgendes allgemeine Aufbauschema angegeben (Abb. 1).

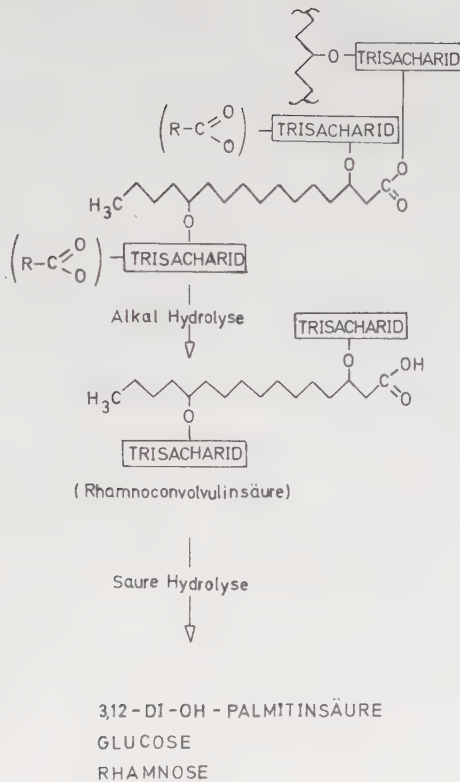


Abb. 1

Die kurzkettigen Fettsäuren besitzen 2 bis 5 Kohlenstoffatome, sie sind teils gerad-, teils verzweigt-kettig und haben außer der Tiglinsäure (trans-2-Methylkrotonsäure) gesättigten Charakter. An flüchtigen Säuren wurden Essig-, Propion-, Butter-, Isobutter-, Valerian-, Isovalerian-, Methyläthylessig-, Trimethylessig-(Pivalin-), trans-2-Methylkroton-(Tiglin-) und β -Hydroxy- β -methylbutter-(Nilsäure) gefunden.

Die Hydroxyfettsäuren unterscheiden sich voneinander in der Kettenlänge (10 - 16 C) sowie in der Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen. Mit Ausnahme der Brasiliolsäure, deren Struktur noch fraglich ist, handelt es sich durchwegs um Mono- oder Dihydroxyfettsäuren. Die Hydroxylgruppen sind bei den Monohydroxysäuren vorwiegend in 11-, seltener in 7-Stellung, bei Dihydroxysäuren immer am 3- und zumeist an 11-, seltener am C-12 lokalisiert.

Folgende Hydroxyfettsäuren wurden gefunden: 7-Hydroxydecan-, Monohydroxylaurin-, 11-Hydroxymyristin-, 3,11-Dihydroxymyristin-(Ipurol-), Trihydroxymyristin-(Brasiliol-), Monohydroxypentadecan-(Convolvulinol-), 3,12-Dihydroxypalmitin-(Operculinol-), 11-Hydroxypalmitin-(Jalapinol-) und 3,11-Dihydroxypalmitin-Säure.

Aus Resina operculina, dem brasilianischen Jalapenharz, wurde neben den flüchtigen Säuren auch eine nicht flüchtige C_{10} -Säure abgespalten, die Exogonsäure (Abb. 2) genannt wurde²⁾. Diese Säure gestattet eine qualitative Unterscheidung zwischen brasilianischem und mexikanischem Jalapenharz, die sehr häufig miteinander verwechselt werden³⁾. Die Exogonsäure stellt eine 3,6, 6,9-Dioxidodecansäure dar und liegt als Gemisch von vier Stereoisomeren vor.

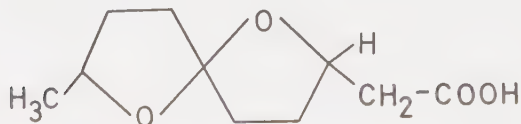


Abb. 2
Übersichtsformel von Exogonsäure

Als Zuckerkomponenten wurden bisher D-Glucose, L-Rhamnose, D-Fucose und D-Chinovose gefunden. In der Literatur wird noch von einer 6-Desoxy-Gulose berichtet.

II. Bisherige Isolierungs- und Aufarbeitsverfahren

Bei den ersten in der Literatur berichteten Untersuchungen über die Glykosidharze der Convolvulaceen-Familie wurden ähnliche Arbeitsmethoden angewandt.

Das mehr oder weniger vorgereinigte Harz wurde in einen ätherlöslichen und ätherunlöslichen Teil getrennt. Der die Hauptmenge an Harz enthaltende ätherunlösliche Teil wurde anschließend mit Bariumhydroxid versetzt, um den Glykolipid-Komplex in die kurzkettigen Fettsäuren und die dem Komplex zugrundeliegenden Glykosidsäuren zu spalten. Die Glykosidsäuren wurden dann mit Mineralsäure hydrolysiert, wobei die Zucker und Hydroxyfettsäuren freigesetzt wurden. Auf diese Weise konnten z.B. um die Jahrhundertwende von Kromer⁴⁾ und Hoenel⁵⁾ die Zucker, flüchtigen Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren von Jalapin erhalten werden. Später isolierten Votocek und Valentin⁶⁾ eine kristalline Glykosidsäure, deren Aglykon Votocek und Prelog⁷⁾ als 3,12-Dihydroxypalmitinsäure identifizierten. Bauer und Junge⁸⁾ isolierten nach diesem Verfahren die Skammoninsäure aus Skammoniumharz. Jaretsky und Risse⁹⁾ untersuchten verschiedene Glykosidharze und brachten ihre Wirksamkeit mit der Löslichkeit und Säurezahl in Verbindung. Bei Shellard¹⁰⁾ findet sich eine Zusammenfassung über die bis dahin durchgeführten Untersuchungen.

Später wurden verbesserte Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung der Glykosidsäuren erfolgreich angewandt. Eine dieser neuen Techniken bestand im Einsatz der Chromatographie. Auterhoff und Demleitner¹¹⁾ trennten die ätherlöslichen und ätherunlöslichen Anteile und fraktionierten den ätherlöslichen Teil an einer Aluminiumoxid-Säule mit Chloroform und Chloroform-Methanol-Mischungen als Lösungsmittel. Die Glykosidsäure selbst wurde ebenfalls durch Chromatographie an Aluminiumoxid mit Chloroform als Lösungsmittel gereinigt.

Smith und Mitarb.¹²⁾ extrahierten die gepulverten Samen von Ipomoea parasitica (HBK) Don. mit Petroläther und reinigten den Extrakt mit verschiedenen Lösungsmitteln. Man erhielt eine Glykosidmischung, aus der die Glykosidsäuren wiederum durch alkalische Hydrolyse gewonnen wurden.

Saure Hydrolyse lieferte nach 6 Stunden zwei Zucker und ein Säure-stabiles Glykosid, das erst durch 18 stündige Hydrolyse mit 1 N HCl gespalten wurde.

Legler¹³⁾ extrahierte die Blätter von *Ipomoea fistulosa* Mart. et Chois. zur Entfernung von Chlorophyll und Lipiden zunächst mit Methylenchlorid. Sie erhielten den Hauptharzanteil durch anschließende Extraktion mit Methanol. Das Harz wurde in Methanol-Äthanol (1:8) aufgenommen und durch Zugabe von Isopropanol in zwei Glykosidfraktionen A und B getrennt, wobei das Glykosid B im Fällungsniederschlag zu finden war.

Legler versuchte eine Reinigung des Glykosids B auf einer Aktivkohle:Celite (1:1)-Säule, die er mit Methanol und Methanol-Chloroform-Mischungen eluierte. Nach saurer Hydrolyse der Säulenfraktionen wurden folgende vier Aglykone gefunden: 7-Hydroxytetradecansäure, 11-Hydroxytetradecansäure, 11-Hydroxyhexadecansäure und 3,11-Dihydroxytetradecansäure.

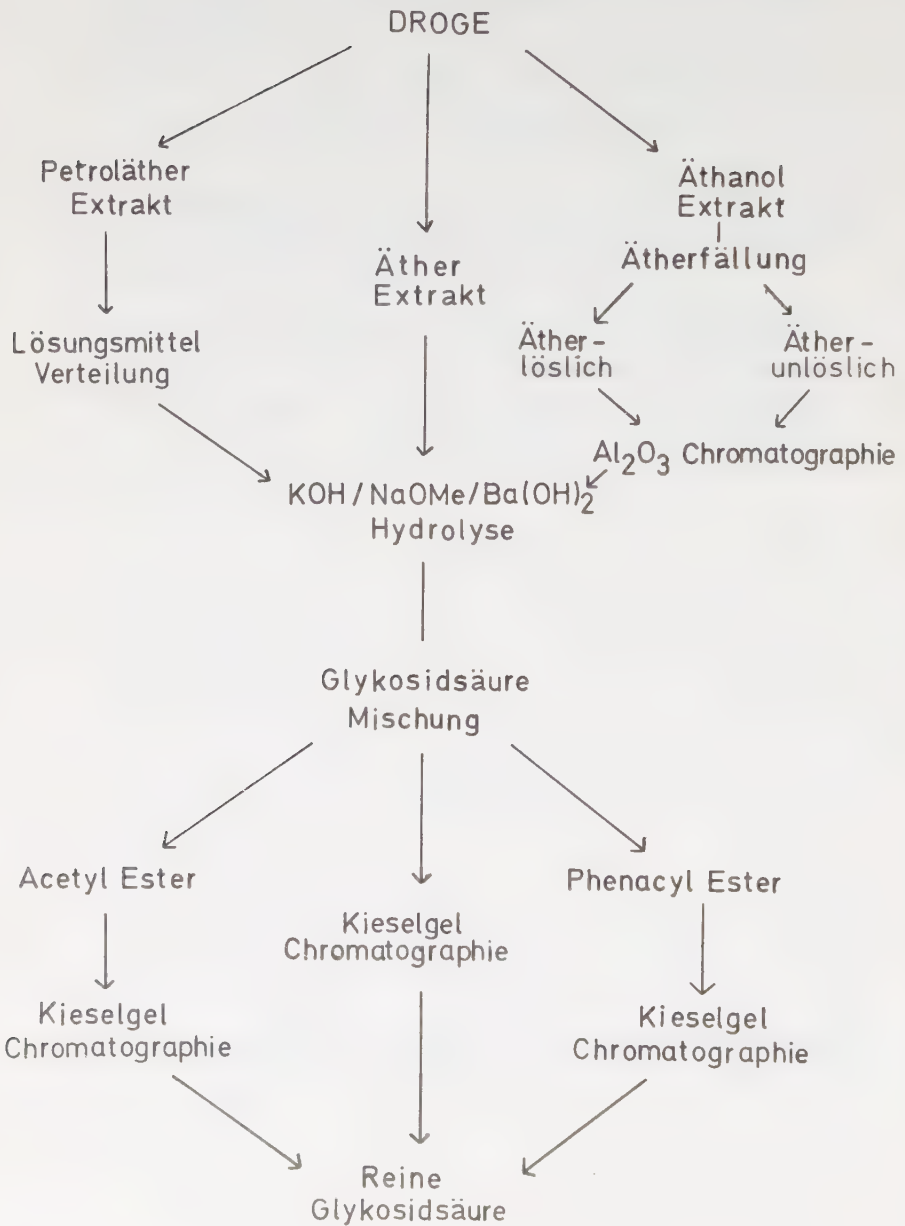
Kawasaki und Mitarb.¹⁴⁻¹⁷⁾ entfernten Sterine und andere Lipide von *Pharbitis Nil Choisy* durch Extraktion mit heißem Benzol. Die Samen wurden dann mit heißem Äthanol ausgezogen und der Extrakt zur Ausfällung der Gerbstoffe mit Bleiacetat versetzt. Nach Entfernung von überschüssigem Blei mit Schwefelwasserstoff wurde Pharbitin erhalten. Pharbitin wurde mit Bariumhydroxid hydrolysiert und die zwei chromatographisch nachgewiesenen Pharbitinsäuren C und D als p-Phenylphenacyl ester auf einer Kieselgel-Säule getrennt. Die Säule wurde mit Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase) eluiert.

Wagner und Kazmaier¹⁸⁾ reinigten das Harz von *Ipomoea operculata* Martin wie Kawasaki durch Zugabe von Bleiacetat und fällten anschließend das Harz fünfmal mit Äther. Statt mit Bariumhydroxid wurde das Harz mit Natriummethylat versetzt, um die kurzkettigen Fettsäuren katalytisch zu spalten und die Rhamnoconvolvulinsäure zu gewinnen. Diese Glykosidsäure wurde in Form ihres Acetates auf einer Kieselgel-Säule mit Benzol-Aceton (1:1) gereinigt.

Singh und Stacey¹⁹⁾ extrahierten gepulvertes Wurzelmaterial von *Ipomoea purga* Hayne mit Äthanol und chromatographierten das Harz an einer Kieselgel-Säule mit einem Chloroform-Methanol-(4:1)-Gemisch. Nach katalytischer Hydrolyse mit Natriummethylat waren mit Dünnschichtchromatographie vier Flecke sichtbar. Eine der vier Substanzen war nur in Äther löslich und konnte auf diese Weise rein isoliert und kristallisiert werden.

Sarin und Mitarb.²⁰⁾ reinigten das Harz von *Ipomoea leari* Paxt. durch aufeinanderfolgende Lösungsmittelfraktionierung mit Hexan, Chloroform und Aceton. Dann wurde das vereinigte Produkt auf einer Kieselgel-Säule mit Chloroform-Methanol (3:1) weiter gereinigt. Nach alkalischer Hydrolyse mit NaOH erhielt man die reine Glykosidsäure. Im nachfolgenden Schemabild sind die wichtigsten bis heute angewendeten Isolierungsverfahren für Glykosidsäuren zusammengestellt.

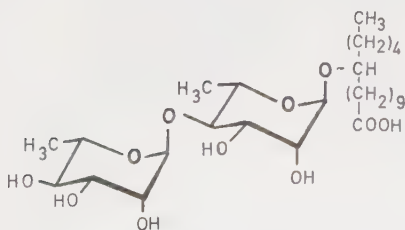
Schemabild 2



III. Bisher strukturell aufgeklärte Glykosidsäuren

Obwohl die Harzglykoside schon lange Gegenstand chemischer Untersuchungen waren, gelang die erste Strukturaufklärung einer Glykosidsäure erst im Jahre 1967. Khanna und Gupta⁸⁹⁾ isolierten eine Glykosidsäure aus *Ipomoea muricata* Jacq., die sie Muricatin B nannten. Die Verbindung von der Summenformel $C_{28}H_{32}O_{11}$ lieferte bei der sauren Hydrolyse 2 Mol Rhamnose und 1 Mol einer Hydroxyfettsäure. Die Struktur des Aglykons von der Summenformel $C_{16}H_{32}O_3$ wurde durch Oxidation und Analyse der Spaltprodukte geklärt. Es handelt sich um die 11-Hydroxyhexadecansäure. Durch Perjodat-Oxidation, optische Drehung und IR-Spektroskopie erfolgte die Aufklärung der Gesamtstruktur. Demnach sollte es sich um eine 11-[4-O- β -L-rhamnopyranosyl- β -L-rhamnopyranosyl]-oxy-hexadecansäure handeln.

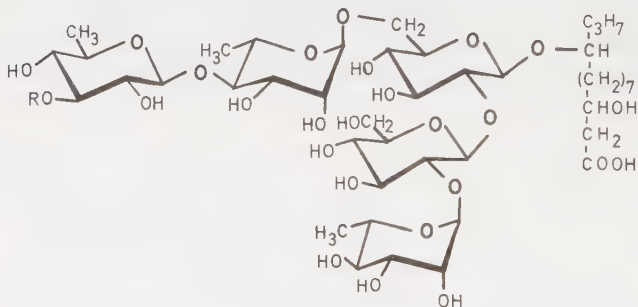
Durch die Synthese des α -L-, α -L-Dirhamnosids in unserem Laboratorium⁹⁰⁾ konnte in der Zwischenzeit entschieden werden, daß dem Saccharidanteil im Muricatin B, wie von uns auf Grund von NMR-Untersuchungen und der optischen Drehwerte schon vorher vermutet wurde, die α -L-, α -L-Struktur zukommt.



Kawasaki und Mitarb.¹⁷⁾ klärten die Struktur zweier Glykosidsäuren aus *Pharbitis Nil Choisy* auf. Sie nannten diese Pharbitinsäure C und D. Es sind Penta- bzw. Hexasaccharide der Ipurolsäure mit den drei Zuckern

D-Glucose, D-Chinovose und L-Rhamnose. Beide Glykosidsäuren lieferten nach Permethylierung und Methanolyse folgende partiell methylierten Zucker: 2,3-Di-O-methyl-rhamnose, 2,3,4-Tri-O-methyl-rhamnose, 3,4-Di-O-methyl-glucose, 3,4,6-Tri-O-methyl-glucose und 2,3,4-Tri-O-methyl-Chinovose.

In Pharbitinsäure D wurde auch eine Methyl-di-O-methyl-chinovose gefunden. Um die Zuckersequenz aufzuklären, wurden die Glykosidsäuren mit 80%iger Ameisensäure partiell hydrolysiert. Es gelang ihnen, Glykosidsäuren mit gekürzten Zuckerketten zu isolieren und diese wiederum durch Permethylierung und Abbau bzw. Acetolyse aufzuklären. Der direkt an die Fettsäure gebundene Zucker war Glucose. Der Saccharidanteil ist verzweigt-kettig und besitzt mit Chinovose bzw. Rhamnose als endständige Zucker (1 → 2), (1 → 4) und (1 → 6) Verknüpfungen.

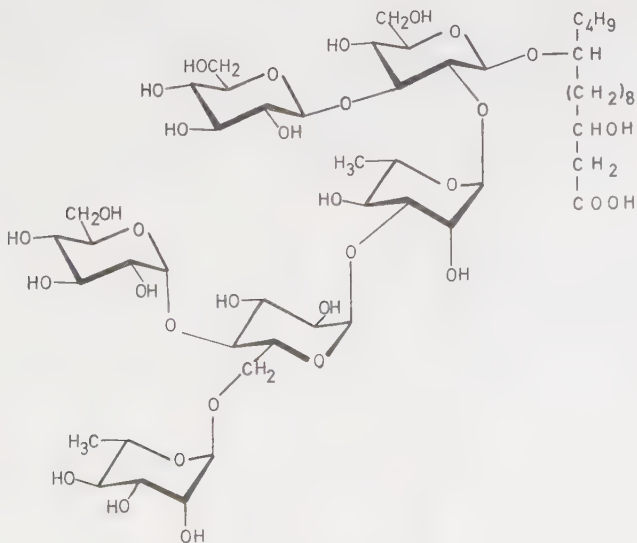


Wagner und Kazmaier¹⁸⁾ isolierten eine bereits von Votocek beschriebene Rhamnoconvolvulinsäure aus *Ipomoea operculata* Martin. Saure Hydrolyse lieferte Glucose und Rhamnose im Verhältnis 2:1 und eine Dihydroxyfettsäure, deren Methylester die Formel $C_{17}H_{34}O_4$ hatte. Die Stellungen der Hydroxygruppen wurden durch Chromatoxidation und Massenspektrometrie festgelegt. Es handelt sich um 3,12-Dihydroxypalmitinsäure. Die Glykosidsäure wurde ebenfalls permethyliert und die durch Methanolyse erhaltenen Produkte über ihre Alditolacetate gaschromatographisch identifiziert. Man

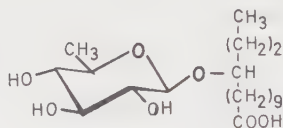
find folgende Produkte: 1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-glucitol, 1,2,3,5-Tetra-O-acetyl-4,6-di-O-methyl-glucitol, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-rhamnitol und 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-rhamnitol.

Nach Durchführung einer Acetolyse konnten folgende Disaccharide isoliert werden: 3-O- β -D Glucopyranosyl-D-Glucopyranose (Lamanaribiose); 2-O- α -L Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(β -D-Glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-Glucopyranose (2- α -L Rhamnopyranosyl-Lamanaribiose); 6-O- α -L Rhamnopyranosyl-D-Glucopyranose (Rutinose); 4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose (Maltose); 3-O- α -D-Glucopyranosyl-L-rhamnopyranose.

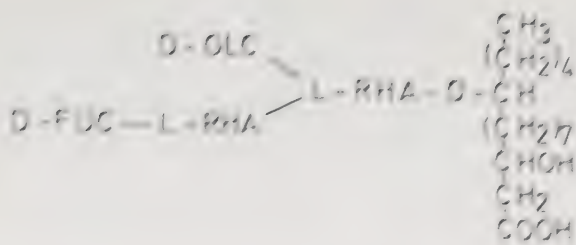
Durch Synthese einiger (1 $\rightarrow$ 3) und (1 $\rightarrow$ 4) verknüpfter Glucosylglucosen und Vergleich mit einigen Disaccharid-Spaltprodukten konnte eine zunächst noch unbewiesene Teilstruktur gesichert und damit die Gesamtstruktur geklärt werden.



19) Singh und Stacey isolierten in reiner Form eine Glykosidsäure aus Convolvulin, dem ätherlöslichen Teil von Ipomoea purga Hayne. Sie fanden nach saurer Hydrolyse D-Chinovose als einzigen Zuckerbaustein. Eine Molekulargewichtsbestimmung ergab für die Glykosidsäure den niedrigen Wert von 395. Da die Permethylierung nur 2,3,4-Tri-O-methylchinovose lieferte, musste es sich um ein Monoglykosid handeln. Die mit dem Methylester der Hydroxyfettsäure durchgeführte Massenspektrometrie ergab 11-Hydroxytetradecansäure als Aglykonanteil.



20) Sarin und Mitarb. isolierten eine Tetrasaccharid-Glykosidsäure aus Ipomoea leari Paxt. Saure Hydrolyse liefert ein Aglykon, dessen Methylester die Summenformel $C_{17}H_{34}O_4$ aufwies. NMR und MS-Untersuchungen des Methylesters und der Oxidationsprodukte des Aglykons ergaben 3,11-Dihydroxyhexadecansäure. Die Monosaccharide waren L-Rhamnose, D-Fucose und D-Glucose. Die quantitative Zuckeranalyse ergab ein Hexose-Methylpentose-Verhältnis von 1:3 und ein Fucose-Rhamnose-Verhältnis von 1:2. Partielle Hydrolyse liefert ein Disaccharid-Glykosid mit Rhamnose und Glucose als Zuckerbausteine. Nach Permethylierung wurden 2,3,4,6-Tetramethoxy-glucose, 2,3,4-Trimethoxy-fucose, 2,3-Dimethoxy-rhamnose und 2-Monomethoxyrhamnose gefunden. Daraus leiteten sie folgende Struktur ab:



Zusammenfassend lässt sich sagen, es entstehen Glykosidbindungen zwischen zwei oder mehreren Monosacchariden, indem ein Informationsträger über Art und Zahl der beteiligten Zucker.

Die Glykosidbindungen von Glykosidbindung aus (Spencer, 1960, von Mann, 1960, 1961). Es fand die Zucker D-Glucose, D-Fucose und L-Rhamnose D-Glucose im Verhältnis 1:1:1 und isolierte die vier Hydroxyfettsäuren: 1-Hydroxyhexansäure, 2-Hydroxyhexansäure, 3-Hydroxyhexansäure und 4-Hydroxyhexansäure. Aus anderen Untersuchungen (S. 10, 11) über Harn-Glykosidbindungen geht hervor, daß die beiden Hydroxyfettsäuren Isopropyl- und Isopropyl-sterwigen und D-Glucose, L-Rhamnose und D-Fucose die am häufigsten vorkommenden Zuckerbausteine darstellen. Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Untersuchungen kann man wie folgt zusammenfassen:

Die Glykosidbindungen stellen Glykole von Di-, Tri-, Tetra-, Penta- oder Hexasacchariden mit Mono- oder Dihydroxyfettsäuren dar. Die Saccharide sind linear oder verzweigt. Die Fettsäuren besitzen eine Kettenlänge von 6 bis 10 Kohlenstoffatomen. In der Natur sind die Hydroxygruppen einer Dihydroxyfettsäure geknüpft gefunden worden. Die freien Hydroxygruppen der Zucker sind mit kurzkettigen (2 bis 5 Kohlenstoffatomen) Fettsäuren und untereinander vermutlich noch mit anderen Gruppen (z. B. Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, etc.) verbunden. Diese makromolekularen Verbindungen unterscheiden sich in ihrer Löslichkeit. Die meisten

die Trennung der ätherlöslichen und ätherunlöslichen Glykolipide die erste Stufe der Isolierung. Der hohe Veresterungsgrad dieser Harze und ihre hohen Molekulargewichte lassen eine Isolierung der genuinen Verbindung nicht zu. Deshalb beschäftigen sich alle Untersuchungen nur mit der Struktur der Glykosidsäuren, den zentralen Bausteinen dieser komplexen Glykoside.

B. Isolierung und Strukturaufklärung der Microphyllinsäure aus Convolvulus microphyllus Sieb ex. Spreng.

Convolvulus microphyllus Sieb ex. Spreng. ist eine halb-aufrecht bis am Boden liegende, strauchartige Pflanze, die im vorderen Orient und Indien weit verbreitet vorkommt²¹⁾. Da die Pflanze über dem Boden geschnitten ist, sind die Wurzeln der einzige Pflanzenteil, der nicht mit der Droge gesammelt ist. Die Stengel sind 10 - 30 cm lang und 4 - 6 mm dick mit 1 - 3 cm langen, schmalen, lanzettlichen Blättern, die in Zwischenräumen von 10 - 15 mm stehen. Die Blumen kommen in Gruppen von 2 oder 3 vor, sind 15 mm lang, auf 20 mm langen Blumenstielen und haben rosa Blumenkronen. In der indischen Volksmedizin wird das Kraut als Abführmittel verwendet^{22,23)}.

I. Darstellung des Rohglykolipids

Vor Beginn der eigentlichen Isolierung war zu prüfen, ob in *Convolvulus microphyllus* überhaupt ähnliche Glykolipide wie im Jalapenharz vorkommen. Diese Vorprobe besteht darin, die drei charakteristischen Hauptbestandteile eines Glykolipids, die Hydroxyfettsäuren, die Zucker und die kurzkettigen Fettsäuren nachzuweisen. Diese Spaltprodukte können durch Papier-, Dünnschicht- bzw. Gaschromatographie nachgewiesen werden. Obwohl die Existenz dieser Bestandteile kein absoluter Beweis für das Vorkommen dieser Glykolipidtypen ist, würde ihr Fehlen die Abwesenheit von Glykolipiden bedeuten.

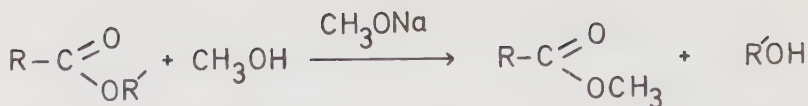
Da wir das Glykolipid aus dem Kraut und nicht aus den Wurzeln zu extrahieren hatten, war die Aufgabe wesentlich komplizierter. Aus der Literatur ist nämlich bekannt, daß die Konzentration an Glykolipiden in Wurzeln und Samen am höchsten und im Kraut am niedrigsten ist. Außerdem enthält ein Krautextrakt wesentlich mehr Verunreinigung, die es gilt, vorher abzutrennen. Durch Extraktion der Droge mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Äther, Petroläther, Methanol und Äthanol erhielten wir in jedem Fall nach dem Eindampfen einen grünen viskosen Extrakt.

Die Hydrolyseprodukte der Methanol- und Petrolätherextrakte wiesen weder Zucker noch Hydroxyfettsäuren auf. Im Äthanolextrakt fanden wir geringe Mengen, im Ätherextrakt dagegen verhältnismäßig viel Zucker, Hydroxyfettsäuren und kurzkettige Fettsäuren. Papierchromatographisch waren im System n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2) drei Zucker nachweisbar. Dünnschichtchromatographisch erhielten wir nur einen Fleck im R_f -Bereich der Hydroxyfettsäuren, während wir gaschromatographisch zahlreiche charakteristische kurzkettige Fettsäuren wie z.B. Tiglin-, Essig-, Propion-, Valerian-, Isovalerian- und Iso-Buttersäure fanden.

Wir versuchten daraufhin das genuine Glykolipid dünnschichtchromatographisch abzubilden. Obwohl wir eine Vielzahl von bekannten Lipidsystemen verwendeten, erhielten wir keinen einheitlichen Fleck, vermutlich wegen des hohen Molekulargewichts dieses Komplexes, das demnach um 10000 oder darüber liegen dürfte.

II. Alkalische Hydrolyse und Isolierung der Glykosidsäure

Während nach älteren Vorschriften die esterartig gebundenen kurzkettigen Fettsäuren durch alkalische Hydrolyse mit Natronlauge oder Barytwasser abgespalten werden, führten wir diese Reaktion mit der wesentlich schonenderen Natriummethylat-Methode durch. Dabei erhält man die kurzkettigen Fettsäuren in Form der Methylester, ohne daß gleichzeitig auch die Glykosidbindungen angegriffen werden (Abb. 3).



R = Kurzkettige Fettsäure

R' = Glykosidsäure

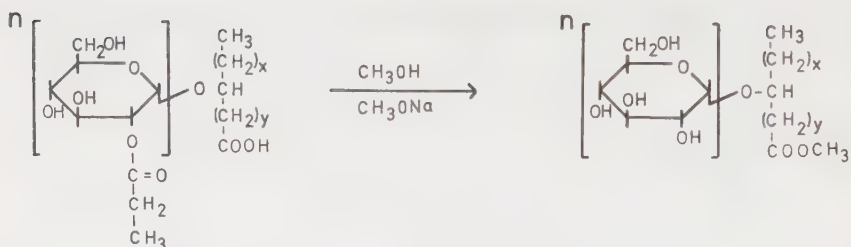


Abb. 3

Gleichzeitig wird dabei die freie Carboxylgruppe der Glykosidsäure in den Methylester umgewandelt. Der Ätherextrakt wurde daher in Methanol gelöst und mit einigen Tropfen 1 N Natriummethylatlösung auf pH 8 - 9 eingestellt. Nach 12 Stdn. wurde die Lösung mit Essigsäure neutralisiert, mit der vierfachen Menge Wasser verdünnt und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die hierbei abgetrennten kurzkettigen Fettsäuren wurden gaschromatographisch untersucht. Wir fällten die wasserlöslichen Glykosidsäuremethylester mit einem Überschuß an Aceton und erhielten einen hellgrünen Niederschlag. Der dünnschichtchromatographische Nachweis des Glykosidsäure-Gemisches erfolgt im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)²⁴⁾. Die Glykosidsäuremethylester erschienen nach Besprühen mit Rhodamin 6 G/NaOH (1:1) bei Betrachtung im UV-Licht als gelbe Flecken auf hellrosa Hintergrund. Zwei Glykosidsäuremethylester erschienen bei einem R_f von 0.40 und 0.80, während zwei andere Lipide als blaue Flecken darüber unmittelbar unter der Lösungsmittelfront nachweisbar waren (Abb. 4).

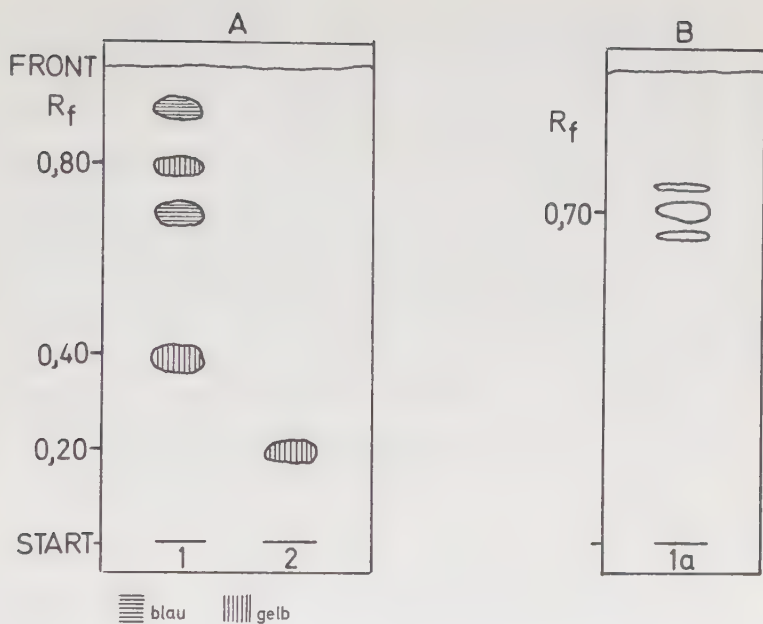


Abb. 4

Dünnschichtchromatographie der Glykosidsäuremethylestermischung
und Acetatmischung aus dem Ätherextrakt

A

1 = Glykosidsäuremethylester-
mischung

2 = Rhamnoconvolvulinsäure

Kieselgel H/Chloroform-
Methanol-Wasser (65:25:4)

B

1a = Glykosidsäureacetatmischung

Kieselgel H/Benzol-Aceton (1:1)

Die DC-Untersuchungen von Kawasaki¹⁶⁾ bei der partiellen Hydrolyse zeigten, daß Glykosidsäuren mit weniger Zucker bei Verwendung mittel-hydrophiler Systeme relativ hohe R_f -Werte besitzen. Im Vergleich zur Rhamnoconvolvulinsäure²⁵⁾, die ein Hexaglykosid darstellt, verhalten sich unsere Glykosidsäuren lipophiler und dürften demnach weniger Zucker enthalten. Die höheren R_f -Werte unserer Verbindungen könnten aber auch durch das Vorliegen von prozentual mehr Methylpentosen als Hexosen sowie durch das Vorliegen einer Mono- statt Dihydroxyfettsäure bedingt sein. Ein Teil der Glykosidsäuremethylestermischung wurde wie üblich in Pyridin gelöst und mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das Acetat wurde dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Benzol-Aceton (1:1) untersucht. Nach Besprühen mit Schwefelsäure und Erhitzen auf 100° C wurden ein Glykosidsäureacetat in höherer Konzentration und mehrere andere Produkte von geringer Konzentration (siehe Abb. 4) gefunden.

Da acetylierte Glykosidsäuren, die sich nur in zwei oder drei Acetylgruppen unterscheiden, am Chromatogramm keinen R_f -Unterschied geben und somit nur als ein Fleck wandern, versuchten wir die entacetylierten Glykosidsäuremethylester über eine Kieselgel-Säule im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) zu trennen. Da die Substanz stark verunreinigt war, musste über mehrere Säulen getrennt werden, um ein reines Produkt zu erhalten. Die Glykosidsäuremethylester sind jedoch sehr empfindlich und zersetzen sich nach längerem Kontakt mit dem Kieselgel. Deshalb wurde nur eine grobe Trennung der Glykosidsäuremethylester erreicht. Wir acetylierten die erhaltene vorgereinigte Mischung und reinigten weiter zunächst über eine Kieselgel-Säule und dann durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Benzol-Aceton (1:1). Aus 1000 g gepulvertem Kraut wurden auf diese Weise 3.20 g eines trockenen Ätherextraktes und hieraus wieder 200 mg einer reinen Glykosidsäure gewonnen (Schmp. 76 - 79° C). Die Glykosidsäure wurde Microphyllinsäure bezeichnet.

Die durch alkalische Hydrolyse erhaltenen kurzkettigen Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch untersucht. Es wurden Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter-, Isovalerian-, Valerian- und Tiglinsäure gefun-

den. Diese sieben Säuren gehören ausnahmslos zu den zehn bereits in Glykosidharzen gefundenen kurzkettigen Säuren (siehe S. 3).

III. Saure Hydrolyse und Identifizierung der Spaltprodukte

200 mg Microphyllinsäure wurden in 1 N Schwefelsäure hydrolysiert, das Hydrolysat dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt und die Extrakte vereinigt. Die wässrige Lösung verwendeten wir für die Zuckeranalyse. Die Hydroxyfettsäure wurde mit Diazomethan methyliert²⁶⁾ und, wie im folgenden beschrieben, analysiert.

1. Qualitative und quantitative Fettsäureanalyse

a. Chromatographie

Der dünnschichtchromatographische Nachweis des Hydroxyfettsäuremethylesters erfolgte auf Kieselgel-Platten in Äther-Petroläther (3:7)²⁷⁾ mit Pyranin (3-Hydroxy-pyren-5, 8, 10-trisulfonsaures Natrium) als Indikator. Der Hydroxyfettsäuremethylester, der bei Betrachtung im UV-Licht (siehe Abb. 5) als hellblauer Fleck auf grünblauem Hintergrund erschien, hatte einen R_f -Wert von 0.65. Um die Reinheit der Methylester zu prüfen, wurden sie gaschromatographisch auf einer SE-30 1% Säule untersucht (siehe Abb. 6). Im Chromatogramm hatte die Säure verglichen mit α -Hydroxylaurinsäuremethylester und α -Hydroxypalmitinsäuremethylester einen R_t -Wert von 8.0 Min. Es wurde noch eine sehr geringe Verunreinigung gefunden, die aber durch präparative DC entfernt werden konnte. Die Substanz ließ sich bei tiefer Temperatur aus Äther-Hexan (1:1) kristallisieren. Nach zweimaligem Umkristallisieren betrug der Schmelzpunkt $43 - 44^\circ \text{C}$.

Nach dem chromatographischen Verhalten konnte auf eine Hydroxyfettsäure mit 12 bis 16 C-Atomen geschlossen werden. Eine Dihydroxyfettsäure war mit ziemlicher Sicherheit auszuschließen. Die genaue Stellung der Hydroxygruppe und Länge der Kette musste weiteren Analysen vorbehalten bleiben.

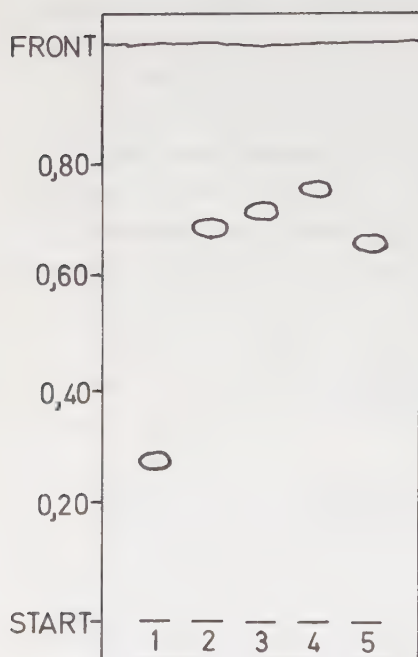


Abb. 5

Dünnschichtchromatographie der
Hydroxyfettsäuremethylester

- 1 = 3,12-Dihydroxypalmitinsäure
- 2 = α -Hydroxylaurinsäure
- 3 = α -Hydroxypalmitinsäure
- 4 = 12-Hydroxystearinsäure
- 5 = Methylester von Microphyllinsäure

Kieselgel H/Pyranin

Petroläther-Äther (3:7)

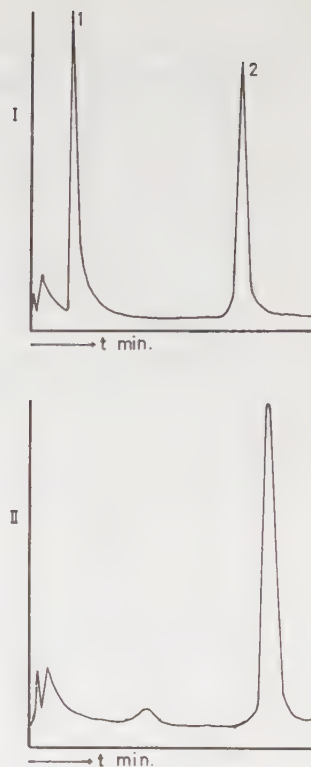


Abb. 6

Gaschromatographie der Hydroxy-
fettsäuremethylester

SE-30 3% Säulentemp. 180° C

- I 1 = α -Hydroxylaurinsäure
- 2 = α -Hydroxypalmitinsäure
- II = Methylester von
Microphyllinsäure

b. IR-Spektroskopie

O'Connor und Mitarb.^{28,29)} untersuchten IR-spektrophotometrisch zahlreiche Hydroxyfettsäuren. Für die Charakterisierung eines gesättigten Methylesters gilt, daß die Carbonylbande etwa bei 1750 cm^{-1} liegt, während die C-H Valenzschwingungsbanden bei ca. 1450 und C-O-Deformationsbanden bei 1300 , 1250 und 1170 cm^{-1} auftreten.

Unser Fettsäuremethylester wies eine Hydroxylbande bei 3420 cm^{-1} und eine Esterbande bei 1735 cm^{-1} auf. Das Fehlen der Bande bei 1650 cm^{-1} für C=C deutete an, daß es sich um einen gesättigten Fettsäuremethylester handelte. Außerdem gab es Banden im C-O Deformationsbereich sowie Banden im Bereich $1150 - 1350\text{ cm}^{-1}$, die für alkoholische OH-Gruppen an Kohlenwasserstoffketten typisch sind.

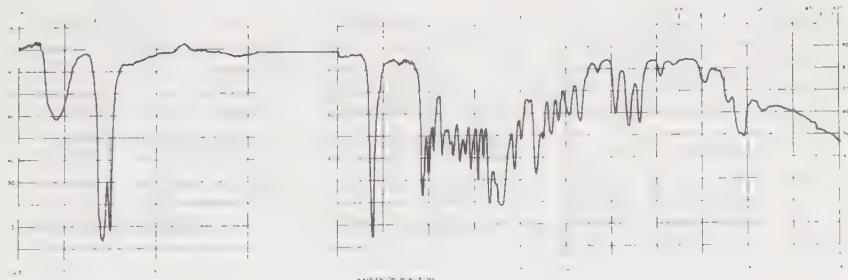


Abb. 7

IR-Spektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters der Microphyllinsäure

c. NMR-Spektroskopie

Hopkins und Mitarb.^{30, 31)} u. a. haben sich intensiv mit der NMR-Spektroskopie von Hydroxyfettsäuren und ihren Methylestern beschäftigt. Folgende allgemeine Zuordnungen für die H-Signale von Hydroxyfettsäuremethylestern werden gegeben:

<u>δ</u>	<u>Gruppe</u>
0,9	$-\text{CH}_3$
1,3	$-\text{CH}_2$ -(Kette)
2,3	$-\text{CH}_2$ -(α CH_2)
3,6	$-\text{CH}$ (CHOH -Gruppe in der Kette)
3,7	$-\text{CH}_3$ (des Methylesters)

Das Hydroxylproton liefert im allgemeinen ein scharfes Signal, dessen Lage von der jeweiligen Position an der C-Kette abhängt³²⁾.

Da der $-\text{CH}_2$ -Peak unserer Substanz für 24 Protonen integriert und eine Doppelbindung abwesend ist, muß eine gesättigte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen vorliegen. Ein Signal bei $\delta = 2,29$, das für zwei Protonen integriert, deutet darauf hin, daß die α -Stellung keine Hydroxylgruppe trägt. Die β -Stellung kann gleichfalls nicht substituiert sein, da dann das α - CH_2 als Triplet aufzutreten müßte. Da das Hydroxylsignal bei $\delta = 1,52$ für ein Proton integriert, muß es sich um eine Monohydroxypalmitinsäure mit der Hydroxylgruppe zwischen den C-Atomen 4 und 15 handeln (siehe Abb. 8).

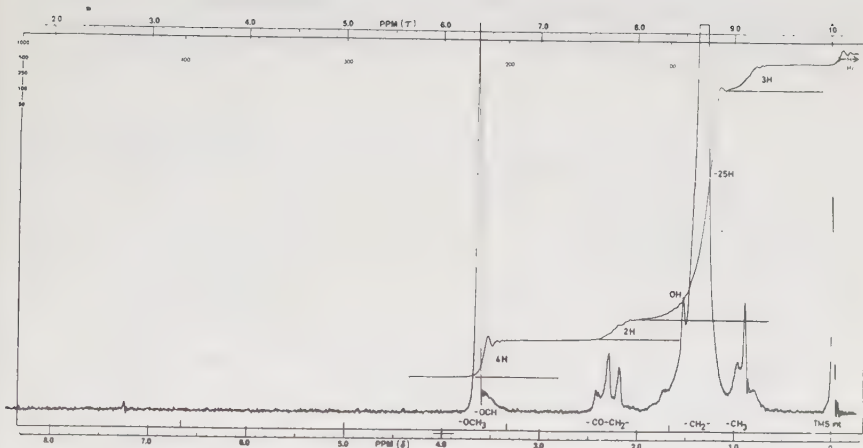
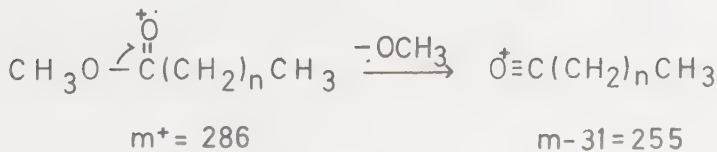


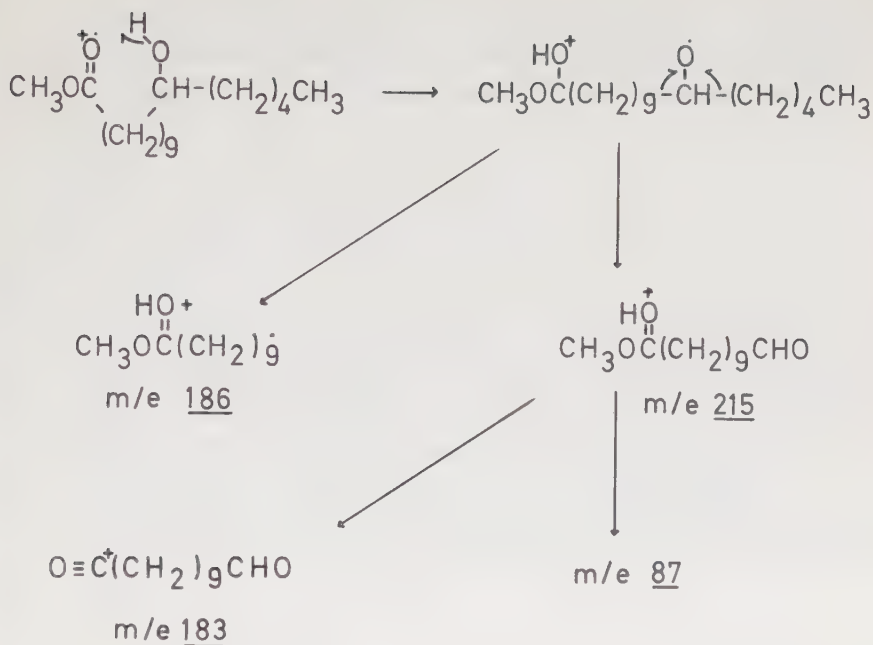
Abb. 8

NMR-Spektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters der Microphyllinsäure

d. Massenspektrometrische Untersuchung

Die erste systematische massenspektrometrische Untersuchung von Hydroxyfettsäuremethylestern wurde von Ryhage und Stenhagen³³⁾ durchgeführt. Der Mechanismus der Fragmentierung und Interpretation der charakteristischen Peaks wurde von McCloskey³⁴⁾ zusammengefasst. Das Molekularion M^+ kann genau angegeben werden³⁵⁾. Das M^+ Ion, das durch einfachen Bindungsbruch entsteht, wird durch das Acyliumion M-31 bewiesen.





Eine Reihe von Peaks stammen von Kohlenwasserstoff-Ionen. Diese Ionen (m/e 41, 55, 69 und 83) entstehen aus der Kette $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ durch einfachen Bindungsbruch und Umlagerung.

Das Massenspektrum (siehe Abb. 9) deutet endgültig darauf hin, daß es sich um 11-Hydroxypalmitinsäure (Jalapinolsäure) handelt.

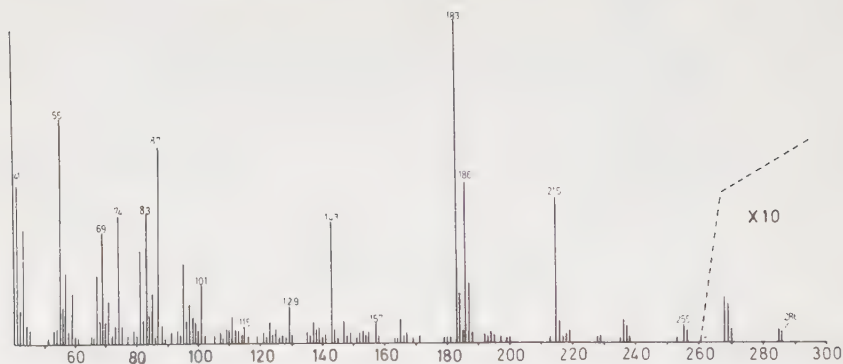


Abb. 9

Massenspektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters der Microphyllinsäure

e. Bestimmung des Fettsäure-Saccharid-Verhältnisses

Für die quantitative Bestimmung der Fettsäure wurde eine genau gewogene Menge Glykosidsäureacetat mit NaOCH_3 in Methanol p.A. entacetyliert und die gebildeten Methylacetate mit Äther ausgeschüttelt. Der resultierende Glykosidsäuremethylester wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in zwei genau gewogenen Portionen mit 1-N H_2SO_4 hydrolysiert. Die Hydroxyfettsäure wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und wie der Zuckeranteil über P_2O_5 getrocknet. Auf diese Weise erhält man für die Acetylgruppen 30,1% des Gesamtgewichts. Der Glykosidsäuremethylester setzt sich aus 23,1% Hydroxyfettsäureanteil und aus 75,4% Zuckeranteil zusammen.

Da wir für das Glykosidsäureacetat ein Molekulargewicht von 1460 ermittelten, muß die Verbindung 10 bis 11 Acetylgruppen enthalten, was wiederum auf einen Oligosaccharidanteil mit 4 oder 5 Zuckerbausteinen hinweist.

IV. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

a. Chromatographie

Die wässrige Lösung wurde nach saurer Hydrolyse und Ausschüttelung mit Chloroform dünn- und papierchromatographisch auf Monosaccharide untersucht. Die Papierchromatographie wurde mit Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2) durchgeführt, die Monosaccharide mit Anilinphthalatreagenz³⁸⁾ sichtbar gemacht. Wir erhielten drei Flecke, die in ihren R_f -Werten den Zuckern Glucose, Rhamnose und Fucose entsprachen. Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Fertigplatten im gleichen Laufmittel ergab das gleiche Ergebnis (siehe Abb. 10).

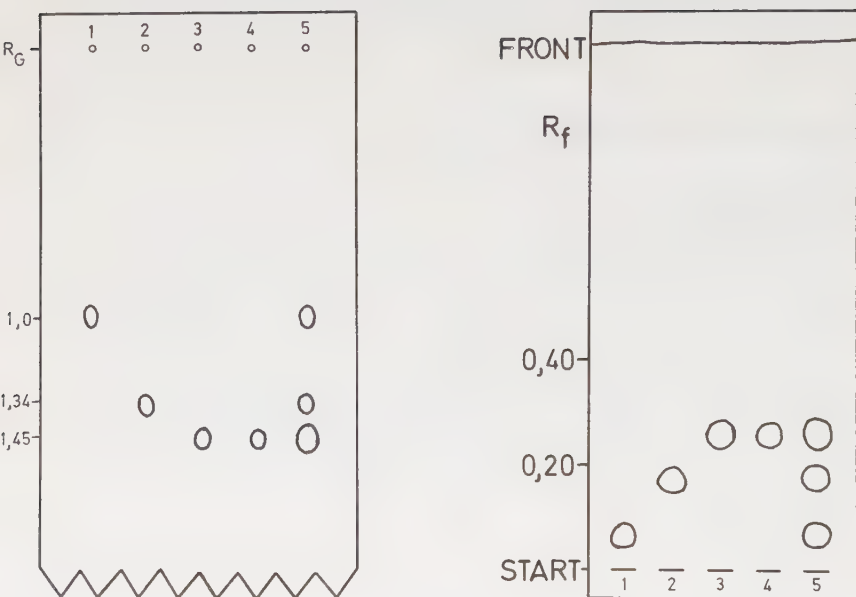


Abb. 10

Papier- und Dünnschichtchromatographie der freien Zucker

1 = Glucose

4 = Chinovose

2 = Fucose

5 = Hydrolyseprodukte der

3 = Rhamnose

Microphyllinsäure

Papier: 2043 b (Schleicher und Schüll)

Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten

Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2)

Dieses Ergebnis ist noch anderweitig zu bestätigen, da durch "einfache" Dünnschicht- und Papierchromatographie z.B. die beiden Zucker Chino- vose und Rhamnose, die oft in Harzglykosiden vorkommen, nicht oder nur schlecht getrennt werden können. Krauss und Mitarb.⁴⁰⁾ haben daher eine Vorschrift für eine solche Trennung ausgearbeitet. Sie konnten diese Zucker auf mit Borsäure gepufferten Papieren im System n-Butanol-Äthylacetat (1:1) trennen. Da wir mit diesem Verfahren keine Auftrennung erhielten, über- führten wir die freien Zucker in flüchtige Derivate, um eine gaschromato- graphische Analyse durchzuführen. Sweeley und Mitarb.⁴¹⁾ haben über eine gaschromatographische Methode berichtet, mit der Zucker als Trimethyl- silylderivate getrennt werden. Peracetylderivate wurden ebenfalls unter- sucht. Die freien Zucker wurden zuerst mit NaBH_4 zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Während Pyranosen und Furanosen getrennte Peaks für die D- und L-Form liefern, ergeben die Alditolderivate der Monosaccha- ride bei der Gaschromatographie nur einen Peak. Über die Acetyl- und Trimethylderivate konnten wir endgültig zeigen, daß der Oligosaccharid- anteil unserer Glykosidsäure aus den folgenden drei Zuckern besteht: Glucose, Rhamnose und Fucose. Der erreichte Grad der Alditolacetat- Trennung genügte, um eine quantitative Bestimmung gaschromatographisch durchzuführen. Das Zucker-Alditolacetat-Gemisch wurde über eine EGSSX- Säule chromatographiert und die Peaks mit einem Integrator ausgemessen. Die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung ist nicht sehr hoch zu bewer- ten, da die Rhamnose und Fucose-Peaks sehr nahe beieinanderliegen und sich überlappen. Außerdem besteht ein großer Unterschied in den Reten- tionszeiten von Glucose und den zwei Methylpentosen. Wir versuchten, diesen zweiten Faktor auszugleichen, indem wir nach dem Fucose-Peak die Säule erhitzen ($16^\circ \text{C}/\text{Min.}$ bis 205°C), wodurch wir den Glucose-Peak schneller erhielten. Diese Methode ergab ein Monosaccharidgemisch von Rhamnose-Fucose-Glucose im Verhältnis 5:2:1 (siehe Abb. 11).

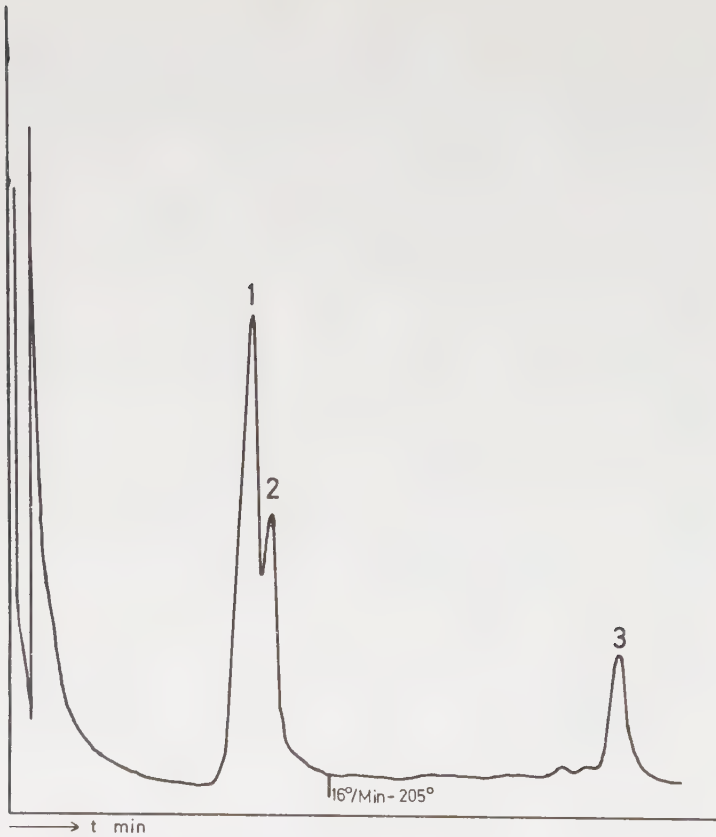


Abb. 11

Gaschromatographie der Alditolacetate

EGSS-X 10% Säulentemp. 180°C (nach 12 Min. $16^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis 205°C programmiert)

1 = Rhamnitol-acetat

2 = Fucitol-acetat

3 = Glucitol-acetat

b. Spektralphotometrische Zuckeranalyse

Da die gaschromatographische quantitative Bestimmung der Monosaccharide der Microphyllinsäure ungenaue Werte lieferte, setzten wir die Spektralphotometrie ein. Früher wurde der Zuckergehalt der Harzglykoside mit verschiedenen chemischen Methoden ermittelt. Votocek und Valentin⁶⁾ sowie Bauer und Junge⁸⁾ bestimmten z. B. den Gesamtzuckergehalt jodometrisch und den Glucosegehalt durch Vergärung. Die moderneren quantitativen Zuckerbestimmungen werden zumeist spektralphotometrisch durchgeführt, nachdem die Monosaccharide zuvor z. B. mit konzentrierter Schwefelsäure in Furfuralderivate⁴²⁾ umgewandelt worden waren. Die gebildeten Derivate sind von der Art des Zuckers abhängig, je nachdem ob z. B. von Pentose, Methylpentose oder Hexose ausgegangen wurde. Diese Furfuralderivate können mit Cystein, Anthron, Resorcinol, α -Naphthol, Phenol, Anilin oder anderen Verbindungen umgesetzt und dann an Hand von Absorptionseichgeraden bestimmt werden. Theoretisch besitzt die Cystein-Schwefelsäure-Methode nach Dische⁴³⁾ die größten Vorteile. Hiermit ist es möglich, verschiedene Zuckerarten in einer Probe des Zuckergemisches nebeneinander zu bestimmen, da ihre Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen liegen. Z. B. ergibt die Differenz der Extinktion bei $E = 414$ und 380 nm den relativen Hexosegehalt, wobei keine Störung durch Methylpentosen oder Pentosen auftreten. Ähnlich können Methylpentosen und andere Pentosen nebeneinander gemessen werden.

Nach der von Dische⁴⁴⁾ angegebenen Vorschrift erhält man oft bis zu 20% differierende Werte. Am zuverlässigsten erwies sich eine von uns modifizierte Methode. Nicht direkt anwendbar war diese Methode jedoch für die Bestimmung des Fucose- und Rhamnosegehalts, da beide Methylpentosen darstellen. Hier kann nur das Verhältnis des Gesamtmethylpentosegehaltes in Beziehung zu Glucose angegeben werden. Um die relativen Molverhältnisse zu erhalten, muß man die einzelnen Monosaccharide trennen. Da bei Vorliegen von je 100 mg Glucose, Fucose und Rhamnose im Gemisch eine Trennung auf Merck Kieselgel-Fertigplatten leicht möglich war (siehe Abb. 10, S. 28), wurden die einzelnen Zucker des Microphyllinsäure-

Zuckergemisches nach dem Auskratzen der Flecke und Elution gemessen. Das Molverhältnis wurde von einer Eichkurve abgelesen. Wir wählten hierfür die Anthron-Schwefelsäure-Methode, da diese gut und leicht reproduzierbar ist^{45, 46)}. Wir ließen drei verschiedene Konzentrationen von Glucose, Rhamnose und Fucose auf einer Platte in drei verschiedenen Konzentrationen laufen. Alle Flecke wurden ausgekratzt, eluiert und gegen einen Blindwert gemessen. Die Ergebnisse der drei Einzelmessungen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1

<u>Probe</u>	<u>µg Rhamnose</u>	<u>µg Glucose</u>	<u>µg Fucose</u>
1	46.0	17.0	18.0
2	86.0	29.0	28.0
3	115.0	38.0	37.0
<u>Verhältnis</u>	<u>3.14</u>	<u>1.0</u>	<u>1.08</u>

Dieses Verhältnis (3 Rhamnose : 1 Fucose : 1 Glucose) ist theoretisch wahrscheinlicher als das durch Gaschromatographie ermittelte (5 Rhamnose : 2 Fucose : 1 Glucose), da nach der Molekulargewichtsbestimmung bereits vier oder fünf Zucker zu erwarten waren.

IV. Partielle Hydrolyse

Die Sequenz der Monosaccharide des Oligosaccharids und deren Verknüpfungsarten kann über die Isolierung und Identifizierung von Di- und Trisacchariden nach einer partiellen Hydrolyse ermittelt werden. Wir haben diese partielle Hydrolyse mit verschiedenen Mineralsäuren, organischen Säuren und Enzymen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Abgeänderte Bedingungen hinsichtlich Reaktionszeit und Konzentration der eingesetzten Agentien liefern im allgemeinen auch verschiedene Bruchstücke. Zum Beispiel sind 1 → 6 Verknüpfungen stabiler gegenüber milder Hydrolyse mit Mineralsäure als 1 → 4 Verknüpfungen⁴⁷⁾. Bei der Glykogen-

Hydrolyse wurde z.B. durch die Hydrolyse mit 0.05 N Schwefelsäure die 1 → 6 Verknüpfung wahrscheinlich gemacht⁴⁸⁾. Da in unserer Glykosidsäure der Oligosidteil an ein Aglykon gebunden ist, zeigt sie ein anderes Reaktionsverhalten als ein Polysaccharid. Nach milder saurer Hydrolyse mit verschiedenen Mineralsäuren: Salzsäure, Schwefelsäure oder Kiliani-Mischung (eine Mischung aus Salzsäure, Schwefelsäure und Wasser) konnten wir keine Di- oder Trisaccharid-Bruchstücke isolieren. Deshalb versuchten wir, eine Glykosidsäure mit verkürzter Oligosaccharidkette, d.h. mit nur 1, 2 oder 3 Monosaccharid-Einheiten zu erhalten, da ein solches Spaltprodukt ebenfalls zu der Ermittlung der Zuckersequenz beitragen kann.

Microphyllinsäure wurde mit 70%iger Ameisensäure 30 Min. in einem Wasserbad von 90° C nach einer Methode von Kawasaki¹⁶⁾ hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase) aufgetrennt. Die Hydrolyseprodukte (I - VII) wurden mit 1 N Schwefelsäure hydrolysiert und wiederum dünnschichtchromatographisch auf Hydroxyfettsäuren und Zucker untersucht (Abb. 12).

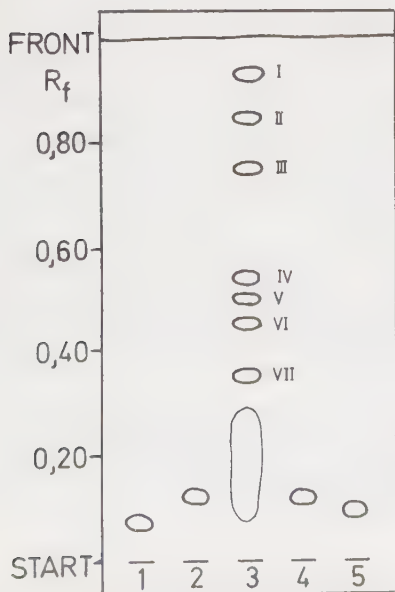


Abb. 12

Dünnschichtchromatographie der
partiellen Hydrolyse-Produkte

1 = Glucose

2 = Fucose

3 = Produkte der partiellen
Hydrolyse

4 = Rhamnose

5 = Microphyllinsäure

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Chloroform-Methanol-Wasser

(7:3:1 Unterphase)

Die Hydrolyseprodukte dieser schwefelsauren Hydrolyse sind folgende:

<u>Substanz</u>	<u>OH-Fettsäure</u>	<u>Zucker</u>
I	Jalapinolsäure	--
II	Jalapinolsäure	Fucose
III	Jalapinolsäure	Fucose und Rhamnose
IV	Jalapinolsäure	Fucose, Rhamnose und Glucose
V, VI, VII	Jalapinolsäure	Fucose, Rhamnose und Glucose

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß es sich bei Verbindung II um ein Hydroxyfettsäure-monofucosid handelt. Die Fucose muß daher direkt an das Aglykon gebunden sein. Es folgen in der Sequenz wahrscheinlich Rhamnose als zweiter und Glucose als dritter Zucker. Die partielle Struktur der Glykosidsäure wäre demnach



vorausgesetzt, daß der Oligosidteil geradkettig aufgebaut ist.

V. Acetolyse

Im Laufe seiner Strukturarbeiten über Pflanzenschleime hat Aspal⁴⁹⁾ versucht, die unterschiedlichen Hydrolyse-Geschwindigkeiten der verschiedenen glykosidischen Verknüpfungen auszunützen und eine Methode entwickelt, die er "kontrollierte Hydrolyse" nennt. Wenn man mit Autohydrolyse (Erhitzen in wässrigen Lösungen ohne Säure) beginnt und allmählich die Reaktionsbedingungen verschärft, werden die verschiedenen Verknüpfungen nach unterschiedlicher Hydrolysedauer gespalten. Eine der Methoden, solche Bruchstücke herzustellen, ist die Acetolyse. Unter Acetylierungsbedingungen in Gegenwart von Säure wurde z.B. aus Cellulose Cellobioseoctaacetat isoliert⁵⁰⁾. Aspal verwendete die Acetolyse bei seinen Untersuchungen des arabischen Gummi^{51, 52)} und von Tragantsäure^{53, 54)}. Er erhielt zahlreiche

Di- und Oligosaccharide, die nicht durch mineralisaure Hydrolyse zu gewinnen waren. Im Gegensatz zur mineralisauren Hydrolyse sind über Acetolysebedingungen $1 \rightarrow 4$ verknüpfte Zucker stabiler als $1 \rightarrow 6$ verknüpfte Verbindungen. Damit die Spaltprodukte nicht wieder untereinander zu Artefakten verknüpft werden, sollte die Konzentration der Zucker unter 0.4% liegen⁵⁵⁾.

Das Glykosidsäureacetat der Microphyllinsäure wurde wie üblich dieser Acetolyse unterworfen. Dünnschichtchromatographisch war ein Gemisch von Oligosaccharidacetaten nachweisbar (siehe Abb. 13). Nach präparativer Abtrennung der Monosaccharidacetate von den Oligosaccharidacetaten entacetylierten wir das Oligosaccharidgemisch und trennten es papierchromatographisch im Laufmittel Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2) auf. Es wurden drei Flecke gefunden (siehe Abb. 14).

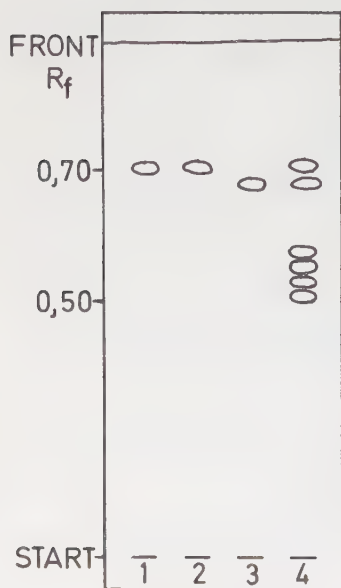


Abb. 13

Dünnschichtchromatographie der
Acetolyseprodukte der Micro-
phyllinsäure

- 1 = Rhamnose-acetat
- 2 = Fucose-acetat
- 3 = Glucose-acetat
- 4 = Acetolyseprodukt

Kieselgel H/Benzol-Äthylacetat (5:4)

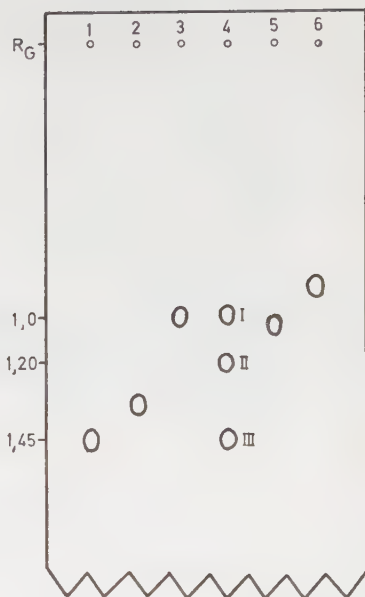


Abb. 14

Papierchromatographie der
freien Zucker nach Acetolyse

- 1 = Rhamnose
- 2 = Fucose
- 3 = Glucose
- 4 = Freie Zucker nach Acetolyse
(Fleck I - III)
- 5 = Scillabiose
- 6 = Rutinose

Papier: 2043 b (Schleicher u. Schüll)

Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2)

Bei der chromatographischen Untersuchung ergab der Vergleich von Fleck I keine Übereinstimmung mit einem der bekannteren Disaccharide wie z.B. Rutinose, Neohesperidose und Scillabiose. Nach Hydrolyse einer Probe dieser Fraktion mit 1 N Schwefelsäure fanden wir nur Glucose und Rhamnose. Deshalb handelt es sich hier wahrscheinlich um ein Trisaccharid.

Fleck II lieferte nach saurer Hydrolyse ebenfalls nur Glucose und Rhamnose. Diese Fraktion wurde papierchromatographisch in den Laufmitteln Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5 Oberphase), Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3), Äthylacetat-Essigsäure-Ameisensäure-Wasser (18:3:1:4)⁵⁶⁾ und Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser (5:5:1:3)⁵⁷⁾ untersucht. In allen Fließmitteln lag Fleck II mit einem R_{GLC} von 1.1 bis 1.25 höher als Glucose, sodaß hier wahrscheinlich ein Disaccharid vorlag. Chromatographisch unterschied sich dieser Zucker in allen Laufmitteln von den nachstehend angeführten Disacchariden, die aus Rhamnose und Glucose bestehen: Rutinose (6-O- α -L Rhamnopyranosyl-D-Glucopyranose), Neohesperidose (2-O- α -L Rhamnopyranosyl-D-Glucopyranose) und β -Scillabiose (4-O- β -D Glucopyranosyl-L-Rhamnopyranose). Dünnschichtchromatographisch war auch das Disaccharidacetat mit keinem Acetat der Vergleichssubstanzen identisch. Auch mit α -Scillabiose (4-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Rhamnopyranose), die in unserem Arbeitskreis synthetisiert worden war⁹¹⁾ und mit einer auch von Aspinal⁵¹⁾ isolierten 4-O- α -L-Rhamnopyranosyl-D-Glucopyranose identisch war, ergab keine Übereinstimmung.

Nach Reduktion dieses Disaccharids mit Natriumborhydrid und anschließender Hydrolyse mit Schwefelsäure konnte chromatographisch nur noch Glucose nachgewiesen werden, sodaß Rhamnose der reduzierende Anteil gewesen war und zu Rhamnitol umgewandelt worden war. Da unser Disaccharid weder α - noch β -Scillabiose war, musste es sich entweder um 2-O-Glucosyl-Rhamnose oder 3-O-Glucosyl-Rhamnose handeln.

1 $\rightarrow$ 3 verknüpfte Zucker sind durch Perjodat nicht oxydierbar. Würde nach Smith-Abbau⁵⁸⁾ Rhamnose gefunden werden, so läge in der Glykosidsäure eine (1 $\rightarrow$ 3) Verknüpfung vor, wenn nicht, so bleibt nur noch eine (1 $\rightarrow$ 2) Verknüpfung möglich.

Wir haben unsere Glykosidsäure mit 1 N Natrium-meta-perjodat oxidiert. Nach Hydrolyse mit 1 N Schwefelsäure zeigte die Dünnschichtchromatographie an Pufferplatten in Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) nur Rhamnose. Deshalb muß die Rhamnose über das C₃-OH mit dem nächsten Partner verknüpft sein.

Fleck III liefert nach saurer Hydrolyse nur Rhamnose. Dieser Fleck hatte in verschiedenen Laufmitteln immer die gleichen R_f-Werte wie Rhamnose. Chromatographisch war sie im Laufmittel Butanol-Äthanol-Wasser (40:11:19) auch nicht identisch mit den zwei Dirhamnosiden, 3-O- α -L- und 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl-L-Rhamnose. Deshalb handelt es sich bei Fleck III wahrscheinlich um Rhamnose selbst, die durch Spaltung der Oligosaccharide während Entacetylierung oder Chromatographie entstanden sein musste.

VI. Permethylierung

Die klassische Methode der Strukturermittlung von Oligosacchariden besteht in der Permethylierung, Methanolyse und Identifizierung der verschiedenen partiellen Methyläther von Monosacchariden. Es gibt zwei wichtige klassische Permethylierungsmethoden. Die erste, von Purdie⁵⁹⁾ entwickelt, verwendet Methyljodid als Methylierungsmittel. Die zweite, von Haworth^{60, 61)} gefunden, erfolgt mit Methylsulfat und Natriumhydroxid als Methylierungsreagentien. Oft müssen Verbindungen zur totalen Verätherung zweimal methyliert werden und zwar zunächst nach Haworth und dann nach Purdie. Von den verschiedenen Verbesserungen dieser Methoden sind die Lösungsmittel-Variationen die wichtigsten. So wurden Polysaccharide z. B. in Thalliumhydroxid⁶²⁾ oder Ammoniak⁶³⁾-Lösung methyliert.

Kuhn und Mitarb.⁶⁴⁾ lösten partiell methylierte Cellulose in N,N-Dimethylformamid und methylierten dann mit Methyljodid und Silberoxid. Die aprotischen Lösungsmittel erleichtern die Reaktion durch Stabilisierung der Zwischenstufe und auch durch Reduktion der Wasserstoffbrückenbindungen. An Stelle von Silberoxid wurden auch Bariumoxid⁶⁵⁾ und Natriumhydrid⁶⁶⁾ eingesetzt. Bei einer weiteren Methode, die von Hakomori⁶⁷⁾ ausgearbeitet

wurde und auf eine Beobachtung von Corey und Chaykovsky⁶⁸⁾ zurückgeht, entsteht bei der Reaktion von Natriumhydrid mit Methylsulfoxid das Methylsulfinyl Carbanion. Polysaccharide, die man in Methylsulfoxid und Natriumhydrid löst, werden in ihre Natriumsalze umgewandelt, sodaß sie leicht mit Methyljodid permethyliert werden können.

Wir haben die beiden Methoden von Kuhn und Hakomori auf ihre Brauchbarkeit für die Permethylierung der Microphyllinsäure untersucht. Das Ergebnis jeder Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie und Aufnahme des IR-Spektrums geprüft. Obwohl beide Methoden auch nach wiederholter Methylierung keine vollständig methylierten Produkte lieferten, waren die Resultate bei der Kuhn'schen Methode besser. Wir kombinierten daher mehrere Methoden. Wir methylierten im Hauptversuch mit Methyljodid in N,N-Dimethylformamid und Natriumhydrid. Die Reaktionsprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch im Laufmittel Benzol-Aceton (2:1) untersucht. Nach Besprühen mit 50%iger Schwefelsäure wurde ein Hauptfleck mit R_f -0.7 und mehrere Nebenprodukte mit niedrigeren R_f -Werten gefunden. Der Hauptfleck konnte durch präparative Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden. Das als gelbe harzige Substanz erhaltene Produkt war, wie das Infrarotspektrum zeigte, voll methyliert.

Für die Hydrolyse der methylierten Glykosidsäuren wurden bisher folgende Säuren verwendet: Schwefel-,⁶⁹⁾ Salz-, Ameisen- und Oxalsäure, außerdem Acetylbromid und methanolische Salzsäure, wobei die Methylglykoside entstehen und schließlich die Kilianimischung^{70,71)}. Ein Überblick über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Vorschriften wurde von Bouveng und Lindberg⁷²⁾ gegeben. Schwefelsäure ist das am häufigsten gebrauchte Reagenz.

Wir hydrolysierten die methylierte Glykosidsäure mit 1 N Schwefelsäure. Obwohl die methylierte Glykosidsäure zunächst in wässriger Schwefelsäure bei Normaltemperatur nicht löslich war, löste sie sich nach mehrminütigem Erhitzen. Die methylierten Monosaccharide können durch Säulenchromatographie oder papier- und dünn-schichtchromatographisch getrennt werden.

Brown und Mitarb.⁷³⁾ entwickelten eine erste Methode zur Papierchromatographie der Methylzucker. Im Laufmittel Butanol-Äthanol-Wasser-Ammoniak (40:10:49:1 Oberphase) erreichten sie eine sehr gute Trennung, obwohl eine einwandfreie Identifizierung noch nicht möglich war. Hirst und Jones⁷⁴⁾ verwendeten mehrere Laufmittel einschließlich Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5) und verglichen die Ergebnisse, um einzelne Methylzucker zu identifizieren. 1963 wurde erstmals die Dünnschichtchromatographie zur Trennung der Methylzucker verwendet^{75,76)}. Wir erhielten die beste dünn-schichtchromatographische Trennung im Laufmittel Benzol-Äthanol (8:2)⁷⁷⁾ (siehe Abb. 15).

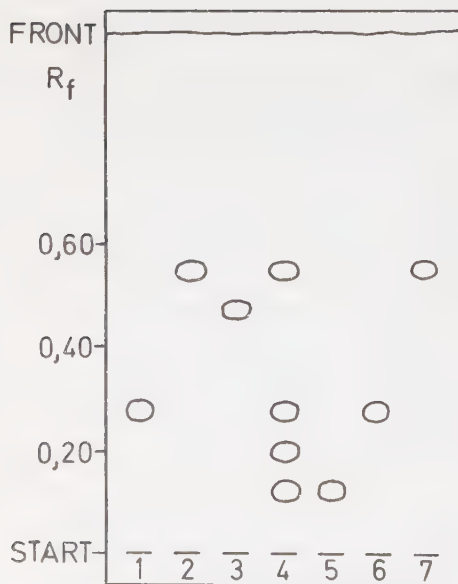


Abb. 15

Dünnschichtchromatographie der Methylzucker

- 1 = 2,3-Di-O-methyl-rhamnose
- 2 = 2,3,4-Tri-O-methyl-rhamnose
- 3 = 2,3,4-Tri-O-methyl-fucose
- 4 = Methylzuckergemisch
- 5 = 2,3-Di-O-methyl-glucose
- 6 = 2,3,6-Tri-O-methyl-glucose
- 7 = 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-glucose

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten
Benzol-Äthanol (8:2)

Obwohl Methylzucker mit unterschiedlicher Zahl von Methylgruppen mit ziemlich gutem Erfolg sowohl papier- wie dünnschichtchromatographisch trennbar sind, macht die Trennung von isomeren Methyläthern Schwierigkeiten. Zum Beispiel gibt es drei Di-O-methylrhamnose: 2,4-Methyl-, 2,3-Methyl- und 3,4-Methylrhamnose, die alle den gleichen oder nahezu den gleichen R_f -Wert besitzen.

1958 wurden erstmals die Methanolyseprodukte von permethylierten Kohlenhydraten gaschromatographisch untersucht⁷⁸⁾. Bei einer Hexose können zwei oder vier Peaks entstehen, je nachdem ob eine Methylierung am C-4 oder C-5-Atom des Zuckers stattfindet. Wenn die Zuckermischung aus vielen Monosacchariden besteht, ist eine Identifizierung wegen der übereinanderliegenden Peaks unmöglich. Dieses Problem wurde von Björndal und Mitarbeitern⁷⁹⁾ dadurch gelöst, daß die Methyläther mit Natriumborhydrid zum Alditol reduziert werden, sodaß nur noch ein Peak für jeden Zucker gaschromatographisch gefunden wurde. Die Alditolderivate waren über die bis dahin verwendeten Säulen nicht trennbar, aber sie konnten über Äthylenglykolsuccinatpolyester Copolymer, ECNSS-M⁸⁰⁾ als Acetylderivate getrennt werden.

Die methylierten Glykosidsäuren wurden hydrolysiert, die Methanolyseprodukte mit NaBH_4 zu ihrem Alditol reduziert, diese mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert und die Mischung über eine ECNSS-M 3%-Säule bei 165°C gaschromatographiert. Es wurden vier Peaks gefunden und nach ihren Retentionszeiten identifiziert (siehe Abb. 16).



Abb. 16

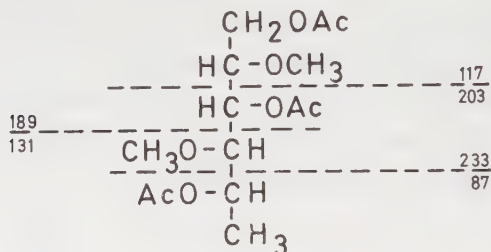
Gaschromatographie der Methylzuckeralditolacetate von Microphyllinsäure

ECNSS-M 3%

Säulentemp. 165° C

2,3-Di-O-methyl-1,4,6-tri-O-acetyl-glucitol (Peak 4) und 2,3,4-Tri-O-methyl-1-mono-O-acetyl-rhamnitol (Peak 1) konnten mit Sicherheit identifiziert werden. Gefunden wurden ferner ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-rhamnitol (Peak 2) und ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-fucitol (Peak 3), doch konnte die Stellung der Methoxygruppen gaschromatographisch nicht festgelegt werden.

Wir erhielten durch präparative Gaschromatographie ungefähr 50 µg von Peak 2 und Peak 3 (siehe Abb. 16). Die Massenspektren beider Substanzen waren gleich. Ein Hauptpeak bei m/e 117 und zwei starke Peaks bei m/e 189 und 131 waren der eindeutige Beweis für das Vorliegen von 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-methylpentositol.

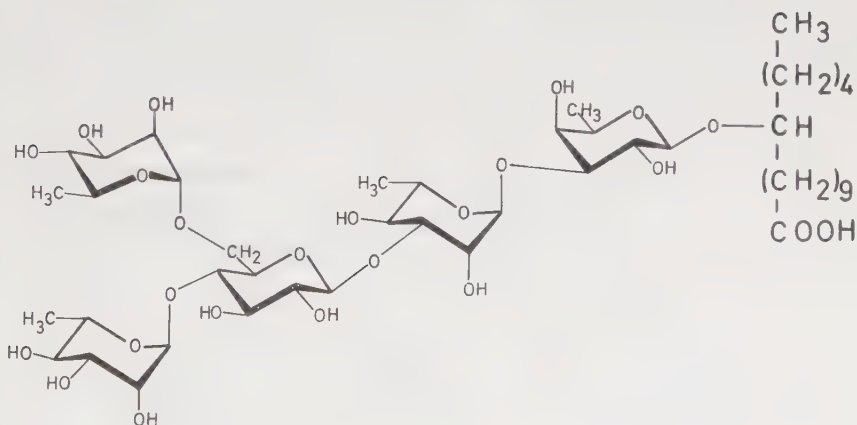


Deshalb entspricht Peak 2 dem 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-rhamnitol, während Peak 3 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-fucitol sein muß, d.h., beide Zucker sind 1 → 3 verknüpft.

Daraus folgt, daß in der Microphyllinsäure eine Glykosidsäure vorliegt, die aus Jalapinolsäure, 3 Mol Rhamnose und je 1 Mol Fucose und Glucose besteht. Durch die partielle Hydrolyse war bewiesen, daß Fucose direkt an die Fettsäure gebunden ist. In der Natur kommen zwar die meisten Fucoside in der α-L-Konfiguration vor, doch scheint in den Harzglykosiden der Convolvulaceen-Familie und in den Herzglykosiden die β-D-Form vorherrschend oder die charakteristische Zuckerform schlechthin zu sein. Nachdem auch Kawasaki und Mitarb.⁹²⁾ ein Jalapinolsäure-O-β-D-fucosid als Strukturfragment der Orizabinsäure C identifiziert hatten (siehe Seite 55), dürfte die Fucose auch in der Microphyllinsäure β-D-konfiguriert sein. Nach Acetolyse isolierten wir eine O-β-D-Glucosyl-1 → 3-rhamnose. Diese 1 → 3 Verknüpfung sowie die 1 → 3 Verknüpfung der Fucose wurde durch Massenspektrometrie der partiell methylierten Alditolacetate bewiesen. Eine ähnliche Glucosyl-1 → 3-rhamnose ist außerdem schon früher von Wagner und Kazmaier¹⁸⁾ aus der Rhamnoconvolvulinsäure isoliert worden.

Aus den gas chromatographisch nachgewiesenen Methyläthern ergibt sich, daß die Glucose mit zwei endständigen Rhamnosen, einmal 1 → 4, ander-
mal 1 → 6 verknüpft sein muß. Die Verknüpfungsweise muß in jedem Fall α-L- sein, da bisher alle in der Natur aufgefundenen Rhamnoside α-L-
Glykoside darstellen ³⁹.

Diese Befunde lassen keine andere Alternative zu, als daß die Microphyllin-
säure ein O-α-L-Rhamnopyranosyl-(1 → 6)-O[α-L-rhamnopyranosyl-
(1 → 4)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 3)-
O-β-D-fucopyranosid der 11-Hydroxypalmitinsäure ist.



C. Isolierung und Beiträge zur Struktur einer neuen Glykosidsäure aus den Wurzeln von Ipomoea Quamoclit Linn.

Ipomoea Quamoclit Linn., im tropischen Amerika heimisch, wird häufig in Indien kultiviert und findet sich dort in vielen Gärten. Die Anwendung von Präparaten aus der Pflanze als Antiphlogistikum war in der indischen Volks-
medizin weit verbreitet ⁸³⁾.

Es wurden je zwei Äther- bzw. Äthanol-Extrakte aus den Wurzeln und Samen der Droge hergestellt. Der einzige Extrakt, der beträchtliche Mengen an Harzglykosiden enthielt, war der Ätherextrakt der Wurzeln.

Die Voruntersuchungen auf Glykosidsäuren wurden in derselben Weise wie bei *Convolvulus microphyllus* geführt. Der Ätherextrakt der Wurzeln wurde wiederum mit Natriummethylatlösung alkalisch hydrolysiert, um die kurzkettigen Fettsäuren zu entfernen und die Glykosidsäuren als Methylester in Freiheit zu setzen. Die Chromatographie der Glykosidsäuremethylester erfolgte dünn-schichtchromatographisch im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4). Nach dem Besprühen mit Rhodamin 6 G und 8%iger NaOH (1:1) (siehe Abb. 17) erschienen auf dem im UV-Licht betrachteten Chromatogramm ein gelber Hauptfleck bei R_f -0.60 und ein zweiter von schwächerer Konzentration bei R_f -0.30. Verglichen mit der Microphyllinsäure musste es sich um eine Glykosidsäure handeln, die ihrem R_f -Wert zufolge entweder weniger Zuckerbausteine oder prozentual mehr Methylpentosen enthielt.

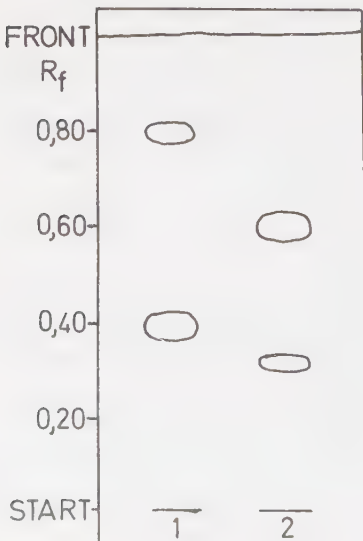


Abb. 17

Dünnschichtchromatographie der
Glykosidsäuremethylestermischung

1 = *Convolvulus microphyllus*

2 = *Ipomoea Quamoclit*

Kieselgel H/Chloroform-Methanol-
Wasser (65:25:4)

Dieselben Vorschriften, die wir für die Reinigung der Microphyllinsäure verwandten, wurden auch für die Isolierung der Hauptglykosidsäuremethylester ($R_f = 0.60$) eingesetzt. Die Mischung wurde zunächst über eine Kieselgel-Säule teilweise gereinigt und dann acetyliert. Das gebildete Glykosidsäureacetatgemisch wurde dann über eine Säule und schließlich durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Benzol-Methanol (1:1) gereinigt. Aus 20.0 g Ätherextrakt erhielten wir 700 mg reinen Glykosidsäureacetats.

Das entacetylierte Acetat wurde mit 1 N Schwefelsäure hydrolysiert und die Hydroxy-Fettsäure vom Zuckeranteil durch Chloroform-Extraktion getrennt. Die Untersuchung der Hydroxyfettsäure erfolgte nach Diazomethan-Methylierung auf gaschromatographischem Wege. Die Retentionszeit auf der SE-30 1% Säule war mit der 11-Hydroxypalmitinsäure aus der Microphyllinsäure gleich. Ein Massenspektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters bewies die Identität (siehe Abb. 9).

Die qualitative und quantitative Zuckeranalyse der Glykosidsäure wurde nach Singh und Stacey⁸⁴⁾ durchgeführt, da hiermit Rhamnose, Chinovose und die anderen Zucker gut getrennt werden. Bei dieser Methode ragt der obere Teil der DC-Platte durch einen schmalen Spalt aus der Kammer heraus, sodaß das Laufmittel am oberen Plattenende kontinuierlich abdunsten kann. Die selbstgestrichenen Platten wurden mit 0.3 M Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer-Lösung imprägniert.

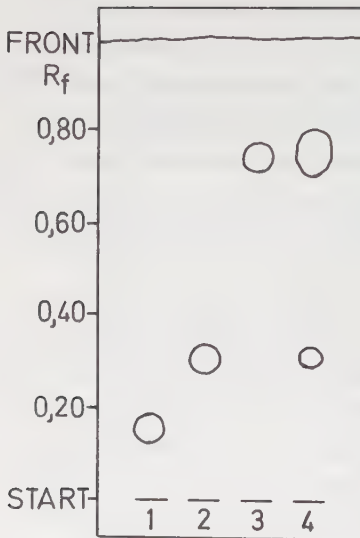


Abb. 18

Dünnschichtchromatographie der freien
Zucker

1 = Glucose

2 = Fucose

3 = Rhamnose

4 = Zuckergemisch von Quamoclitssäure

Kieselgel H/Dinatriumhydrogenphosphat
Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser
(10:4:2:1)

Wie sich herausstellte, erhält man in Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) auch im "geschlossenen System" eine sehr gute Trennung. Die gefundenen Zucker der Glykosidsäure waren Rhamnose und die hiermit isomere Fucose.

Für die quantitative Zuckeranalyse wurde wiederum die Anthron-Schwefelsäure-Methode mit einer kleinen Änderung der Trennungsmethode angewandt. Es wurde eine Standard-Zuckerlösung aus Rhamnose-monohydrat und Fucose im Mol-Verhältnis 3:1 hergestellt. Drei verschiedene Konzentrationen der Zuckerlösung wurden im Laufmittel Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) über Pufferplatten⁸⁴⁾ dünnschichtchromatographisch entwickelt. Die einzelnen Monosaccharide wurden der Platte entnommen und nach der Anthron-Schwefelsäure-Vorschrift behandelt. Die Berechnung erfolgte unter Bezug auf eine Eichgerade. Das Ergebnis aller drei Versuchsansätze war ein Mol-Verhältnis von Rhamnose zu Fucose wie 4:1 (siehe Tab. 2).

Tab. 2

Probe	µg Rhamnose	µg Fucose	Mol-Verhältnis
1	52,0	13,0	4,0 - 1
2	120,0	29,0	4,1 - 1
3	165,0	39,0	4,2 - 1

Durch partielle Hydrolyse des Glykosidsäuremethylesters mit 70%iger Ameisensäure bei $90^{\circ}\text{C}^{15)}$ erhielten wir wie bei der Microphyllinsäure ein aus 6 Hydrolyseprodukten bestehendes Gemisch (siehe Abb. 19).

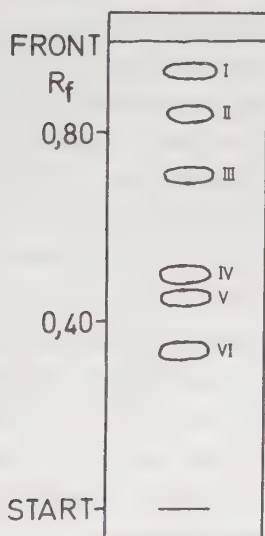


Abb. 19

Dünnschichtchromatographie der
partiellen Hydrolyseprodukte

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten
Chloroform-Methanol-Wasser
(7:3:1 Unterphase)

Diese wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt, mit Schwefelsäure hydrolysiert und auf Zucker und Hydroxyfettsäuren untersucht. Das Ergebnis ist aus Tab. 3 ersichtlich.

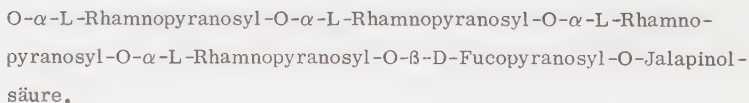
Tab. 3

<u>Hydrolyse-Produkt</u>	<u>Zucker</u>	<u>OH-Fettsäure</u>
I	kein	11-OH-Palmitinsäure
II	Fucose	11-OH-Palmitinsäure
III - VI	Fucose und Rhamnose	11-OH-Palmitinsäure

Daraus folgt, daß die Fucose das Monosaccharid ist, das wie bei der Microphyllinsäure direkt an die Fettsäure gebunden ist.

Die Permethylierung wurde nach Kuhn durchgeführt. Wir erhielten wieder ein Methyläther-Gemisch, aus dem der lipophilste Fleck des Chromatogramms durch präparative Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Benzol-Aceton (2:1)) gewonnen wurde. Ein IR-Spektrum zeigte keine freien OH-Gruppen mehr an. Die permethylierte Glykosidsäure wurde hydrolysiert, die Methanolyseprodukte mit Natriumborhydrid reduziert und mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Die partiell methylierten Alditolacetate wurden gaschromatographisch mit einer ECNSS-M 3%igen Säule getrennt. Wir erhielten drei Peaks, deren Retentionszeiten auf folgende Strukturen passen: 2,3,4-Tri-O-methyl-1,5-di-O-acetyl-rhamnitol, ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-rhamnitol und ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-fucitol.

Obwohl das quantitative Verhältnis der gaschromatographisch ermittelten Methylzucker nicht mit dem Ergebnis der Anthron-Methode übereinstimmte, sprachen die nachgewiesenen Methyläther eindeutig für eine geradlinige Kette des Oligosaccharidanteils (da kein Mono-methylzucker gaschromatographisch ermittelt wurde), wobei der direkt an die Fettsäure gebundene Zucker Fucose sein muß. Da aus den vorliegenden Ergebnissen die Bindungsverhältnisse nicht abgelesen werden können, kommt der Quamoclistsäure folgende allgemeine Struktur zu:



Es handelt sich bei der Quamoclistsäure um die erste höher molekulare Glykosidsäure, die ausschließlich Methylpentosen enthält. Die einzigen Glykosidsäuren, die ebenfalls nur Methylpentosen, aber nur 1 bzw. 2 Mol davon enthalten, sind das Muricatin^{89, 90)} und das β -D-Chinovosid von 11-Hydroxy-tetradecansäure¹⁹⁾.

D. Isolierung und Strukturaufklärung einer Glykosidsäure

aus Ipomoea orizabensis (Pellet) Ledanois.

Der ätherlösliche Teil (Orizabin¹⁰⁾ von Radix Scammoniae "Ipomoea-Harz"¹⁰⁾ wurde erstmals von Kromer⁸⁵⁾ untersucht. Er isolierte eine Hydroxyfettsäure, die mit einer von Samuelson⁸⁷⁾ aus "Jalapin" isolierten Säure identisch war. Er nannte sie Jalapinolsäure und folgerte, daß es sich um eine Hydroxyhexadecansäure handelt. Power und Rogerson⁸⁶⁾ fanden ebenfalls die Jalapinolsäure und außerdem die Tiglin-, Valerian- und Methylbuttersäure als kurzkettige Fettsäuren. Sie konnten zwei Zucker isolieren und den einen als Glucose identifizieren. Der zweite Zucker, eine Methylpentose, war nicht mit Rhamnose identisch. Die Struktur von Jalapinolsäure wurde erstmals im Jahre 1925 von Asahina⁸⁸⁾ als 11-Hydroxypalmitinsäure festgelegt. Auterhoff und Demleitner¹¹⁾ untersuchten den ätherunlöslichen Teil des Harzes und fanden Valeriansäure, Glucose und eine Hydroxyfettsäure, die sie α -Scamminolsäure nannten. Shellard¹⁰⁾ untersuchte die ätherlöslichen und ätherunlöslichen Teile des Harzes und berichtete über folgende Bestandteile

im ätherlöslichen Teil:

Kurzkettige Fettsäuren: Tiglin-, Essig-, Propion-, Isobutter-, Isovalerian-, Methyläthylessig- und n-Valeriansäure.

Hydroxyfettsäuren: Jalapinolsäure (11-Hydroxypalmitinsäure)

Zucker: Glucose, Fucose, Rhamnose

im ätherunlöslichen Teil:

Kurzkettige Fettsäuren: Tiglin-, Essig-, Propion-, Isobutter-, Isovalerian-, Methyläthylessig- und n-Valeriansäure

Hydroxyfettsäuren: Ipurolsäure (3,11-Dihydroxymyristinsäure), Convolvulinsäure (Monohydroxypentadecansäure)

Zucker: Glucose, Fucose, Rhamnose

Die Isolierung der Hauptglykosidsäure des ätherlöslichen Teils des Harzes erfolgte in ähnlicher Weise wie bei der Microphyllinsäure beschrieben. Der Harzanteil, der getrocknete Äthanolextrakt der Wurzel, wurde mit Petrol-äther am Soxhlet extrahiert, um die Lipoide zu entfernen. Anschließend wurde mit Äther extrahiert. Aus 600 g Harz konnten durch Natriummethylat-Hydrolyse 4.6 g einer Glykosidsäuremethylestermischung erhalten werden. Diese Mischung wurde mit Pyridin und Essigsäureanhydrid acetyliert und das Acetat über eine Kieselgel-Säule mit Benzol-Aceton als Eluiermittel (1:1) chromatographiert. Das anfallende Pulver zeigte auf dem Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm im Laufmittel Benzol-Aceton (1:1) nur einen Fleck. Nach Entacetylierung fanden wir nach Besprühen mit Rhodamin 6 G/NaOH-Lösung drei Flecke (siehe Abb. 20).

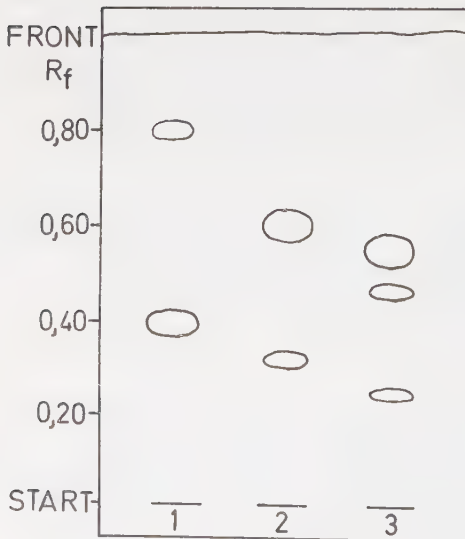


Abb. 20

Dünnschichtchromatographie der
Glykosidsäuremethylestermischung

1 = *Convolvulus microphyllus*

2 = *Ipomoea Quamoclit*

3 = *Ipomoea orizabensis*

Kieselgel H/Chloroform-Methanol-
Wasser (65:25:4)

Der oberste Fleck vom $R_f = 0,55$, der in der Laufhöhe zwischen der Microphyllinsäure und Quamoclitssäure lag, wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie im gleichen Laufmittel rein erhalten. Die Ausbeute betrug 1,2 g.

Der Glykosidsäuremethylester wurde mit 1 N Schwefelsäure hydrolysiert, die wie üblich erhaltene Hydroxyfettsäure in den Methylester umgewandelt und durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie als 11-Hydroxypalmitinsäure identifiziert. Der Schmelzpunkt betrug $43 - 44^{\circ}\text{C}$, die Retentionszeit (siehe Abb. 6) und das Massenspektrum (siehe Abb. 9) waren mit der Jalapinolsäure aus der Microphyllinsäure identisch.

Durch Dünnschichtchromatographie auf gepufferten DC-Platten im Laufmittel Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) wurde bewiesen, daß der Zuckeranteil aus den drei Zuckern Glucose, Rhamnose und Chino-vose bestand.

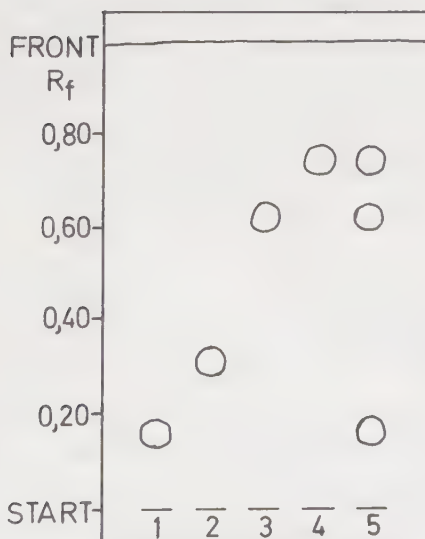


Abb. 21
Dünnschichtchromatographie
der freien Zucker

- 1 = Glucose
- 2 = Fucose
- 3 = Chinovose
- 4 = Rhamnose
- 5 = Zuckergemisch

Kieselgel H/Dinatriumhydrogen-
phosphat Aceton-Methanol-
Chloroform-Wasser (10:4:2:1)

Die quantitative Zuckerbestimmung erfolgte, wie früher angegeben, spektral-photometrisch. Das Ergebnis spricht für das Mol-Verhältnis Chinovose: Glucose:Rhamnose von 2:1:1 (siehe Tab. 3).

Tab. 3

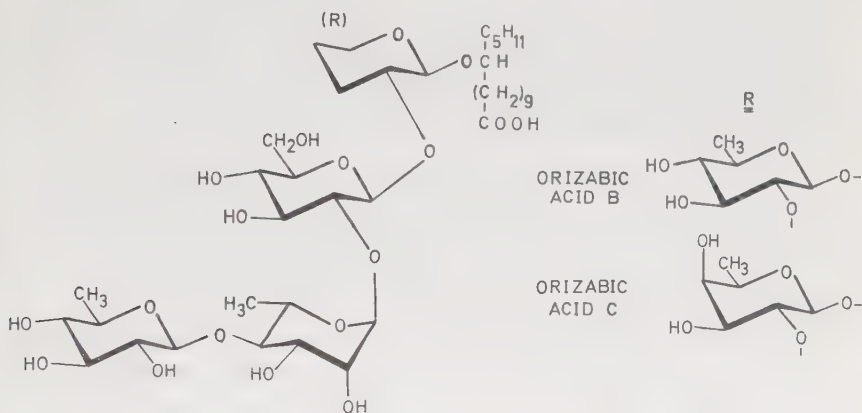
<u>Probe</u>	<u>µg Rhamnose</u>	<u>µg Glucose</u>	<u>µg Chinovose</u>
1	12.0	11.0	21.0
2	20.0	21.0	40.0
3	29.0	32.0	59.0
Mol-Verhältnis	<u>1.0</u>	<u>1.05</u>	<u>1.96</u>

Der Glykosidsäuremethylester wurde wieder nach Kuhn in DMF mit Methyljodid und Silberoxid permethyliert. Da viele Verunreinigungen vorhanden waren, musste das völlig methylierte Glykolipid durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt werden. Die methylierte Glykosidsäure wurde mit Schwefelsäure hydrolysiert, die Methanolyseprodukte reduziert und dann acetyliert. Die Gaschromatographie auf einer ECNSS-M 3%-Säule zeigte vier Peaks, deren Retentionszeiten den folgenden Methylalditol-acetaten entsprachen:

	R _{TG}
2,3,4-Tri-O-methyl-1,5-di-O-acetyl-chinovositol	0.45
3,4,6-Tri-O-methyl-1,2,5-tri-O-acetyl-glucitol	1.95
ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-rhamnitol	0.98
ein Di-O-methyl-tri-O-acetyl-chinovositol	0.90

Bei diesem Stand der Untersuchungen erhielten wir eine private Mitteilung von Herrn Professor T. Kawasaki, Kyushu Universität, Fukuoka, Japan, über die Isolierung und gelungene Strukturaufklärung zweier Glykosidsäuren aus *Ipomoea orizabensis*. Hiernach handelt es sich bei "Orizabic Acid B und C" um die beiden nachstehenden Verbindungen: O-β-D-Chinovopyra-

nosyl-(1 → 4)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-chinovopyranosyl-O-Jalapinolsäure bzw. O-β-D-Chinovopyranosyl-(1 → 4)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-fucopyranosyl-O-Jalapinolsäure.



Das chromatographische Verhalten und die übrigen Daten unserer Glykosid-säure sprechen dafür, daß Identität mit der Orizabic Acid B besteht. Wir haben daher unsere Untersuchungen an dieser Stelle abgebrochen.

Zusammenfassung

Durch partielle Alkalihydrolyse der genuinen Harzglykoside von Convolvulus microphyllus, Ipomoea quamoclit und Ipomoea orizabensis konnten dreie neue Glykosidsäuren, die Microphyllinsäure, die Quamoclictsäure und die Orizabinsäure B auf chromatographischem Wege isoliert und in ihrer Struktur ganz bzw. teilweise geklärt werden.

In jedem Fall liegt ein Oligosaccharid in Form eines Penta- bzw. Tetraglykosids mit der 11-Hydroxypalmitinsäure als Aglykon-Komponente vor.

Die Microphyllinsäure besitzt einen teils geradlinigen und teils verzweigt-kettigen Oligosaccharidaufbau, während die Quamoclitssäure und die Orizabinsäuren einen geradkettigen Aufbau besitzen.

Jede Glykosidsäure besitzt 2 bzw. 3 der 4 bisher in Harzglykosiden nachgewiesenen Zucker und zwar entweder Glucose, Fucose, Rhamnose oder Chinovose. Es konnten alle bisher bekannten Verknüpfungsweisen und zwar $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$ und $1 \rightarrow 6$ Verknüpfungen ohne Wiederholung charakteristischer Disaccharidfragmente nachgewiesen werden.

Alle isolierten Glykosidsäuren stammen aus dem ätherlöslichen Teil. Zwischen der Ätherlöslichkeit und der Glykosidsäurestruktur bestehen keine Wechselbeziehungen. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Ätherlöslichkeit der Harze vom Grad der Veresterung der Zucker mit den kurzkettigen Säuren abhängt.

Beim chromatographischen Vergleich der nunmehr isolierten Glykosidsäuren in einem schwach lipophilen System ergaben sich interessante Beziehungen zwischen der Zahl von Zuckereinheiten pro Aglykon bzw. dem Methylpentose - Hexose-Verhältnis einer Verbindung und dem chromatographischen Verhalten. In Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) besitzt Rhamnoconvolvulinsäure (2 Methylpentose/4 Hexose) einen R_f -Wert von 0.20, Microphyllinsäure (4 Methylpentose/1 Hexose) einen R_f -Wert von 0.40, Orizabinsäure B (3 Methylpentose/1 Hexose) einen R_f -Wert von 0.55, Quamoclitssäure (5 Methylpentose) einen R_f -Wert von 0.60 und Jalapinolsäure-O- β -D-fucosid einen R_f -Wert von 0.85. Die Verminderung der Zuckereinheiten und höhere Methylpentose/Hexose-Verhältnisse lassen allgemein den R_f -Wert einer Glykosidsäure ansteigen. Die verzweigt-kettigen Glykosidsäuren besitzen ebenfalls höhere R_f -Werte als ihre geradkettigen Analoge.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Dünnschichtchromatographie

1. Adsorbens

16 g Kieselgel HF₂₅₄ oder Kieselgel HR (reinst) der Fa. Merck wurden mit 45 ml Wasser angerührt und auf 5 Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen. Die Platten wurden 60 Min. bei 120⁰ C aktiviert.

Zur Herstellung von Pyranin-Fluoreszenzplatten wurden 16 g Kieselgel HF₂₅₄, 5.0 mg Pyranin (3-Hydroxy-Pyren-5, 8, 10 Trisulfonsaures Natrium) zugesetzt und die Platten wie üblich beschichtet.

Zur Herstellung von Pufferplatten wurden 16 g Kieselgel HF₂₅₄ mit 45 ml wässriger 0,3 molarer di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung angerührt und die Platten wie üblich beschichtet. Die Platten wurden bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen und anschließend 2 Stunden bei 110⁰ C aktiviert.

2. Laufmittel für:

Glykosidsäuren

Chloroform p.a.-Methanol p.a.-Wasser (65:25:4)

Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase)

Glykosidsäureacetate

Benzol-Aceton (1:1)

Benzol-Methanol p.a. (9:1)

Fettsäuremethylester

Äther-Petroläther (3:7)

Äther-Petroläther (7:3)

Permethylierte Glykosidsäuren

Benzol-Äthanol p.a. (8:2)

Benzol-Methanol p.a. (92:8)

Methylzucker

Benzol-Methanol p.a. (97:3)

Benzol-Äthanol (8:2)

Zuckeracetate

Benzol-Methanol p.a. (96:4)

Zucker

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

Aceton-Methanol p.a. -Chloroform p.a. -Wasser (10:4:2:1)

3. Sprühreagentien

Glykosidsäuren

0,006%ige wässrige Rhodamin 6 G-Lösung und 2 N Natronlauge (1/1 v/v).

Die Mischung wird stets frisch bereitet.

Nachbehandlung: Sofortige Betrachtung im UV-Licht (252, 360 nm).

Die Glykosidsäuren erscheinen gelb auf rotem Grund.

Glykosidsäureacetate

50%ige äthanolische Schwefelsäure

Nachbehandlung: Erhitzen im Trockenschrank auf 110° C.

Fettsäuren und Fettsäure-Ester

Betrachten im UV-Licht (360 nm).

Sie erscheinen blau auf blaugrünem Grund.

Zucker und Methylzucker

50%ige äthanolische Schwefelsäure

Anilinphtalatlösung (0.93 g Anilin und 1.66 g Phthalsäureanhydrid werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst)

Nachbehandlung: Einige Minuten im Trockenschrank auf 110° C erhitzen.

II. Präparative Dünnschichtchromatographie

20 mg Substanz - gelöst in 1 ml Lösungsmittel - wurden strichförmig auf nach A/I/1 hergestellten Kieselgel HF₂₅₄-Pyranin-Platten aufgetragen, im angebenen Laufmittelsystem bis zu einer Höhe von 18 cm entwickelt und nach dem Abdunsten des Lösungsmittels im UV-Licht (366 nm) betrachtet. Die auf grün-blauem Grunde hellblau fluoreszierenden Zonen wurden mit einer Präpariernadel markiert, ausgeschabt und dreimal je 20 Min. mit Chloroform p.a. durch Rühren am Magnetprüher extrahiert.

III. Säulenchromatographie

Kieselgelsäulen

Verwendet wurde Kieselgel Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min. bei 3 - 6 cm Säulendurchmesser. Zur Trennung von Glykosidsäuren und Glykosidsäureacetaten wurden 100.0 g Kieselgel pro 1.0 g Substanz eingesetzt.

IV. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, durchgeführt.

1. Laufmittel

Zucker

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

Äthylacetat-Eisessig-Ameisensäure-Wasser (18:3:1:4)

Äthylacetat-Pyridin-Wasser (7:2:1)

n-Butanol-Äthanol-Wasser (40:11:19)

Äthylacetat-Essigsäure-Wasser (9:2:2)

n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5 Oberphase)

Methylzucker

n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase)

2. Sprühreagentien für Zucker und Methylzucker

Anilinchthalatlösung nach A/I/3

V. Präparative Papierchromatographie für entacetylierte Acetolyseprodukte

Pro Bogen (ca. 43 cm breit) wurden 20 mg Substanz, gelöst in 1 ml Lösungsmittel, strichförmig aufgetragen und im angegebenen Laufmittelsystem entwickelt. Die durch Besprühen der abgeschnittenen Ränder gefundenen Zonen wurden sofort ausgeschnitten, zerkleinert und mit Methanol p.a. dreimal 10 Min. durch Rühren am Magnetrührer eluiert. Die Lösungen wurden durch ein hartes Filter filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

VI. Gaschromatographie

1. Modell Packard vom Typ 7500 mit einem β -Strahlen-Argon-Ionisationsdetektor und Honeywell-Kompensationsschreiber vom Typ Electronic 17. Hersteller Packard Instrument Company Inc., La Grange, Illinois, USA.
Säule: spiralig gebogene Glassäule 1,8 m/4 mm
Trägergas: Spezial Argon der Fa. Linde, Reinheit 99.99%
Gasdurchfluß: 70 ml/Min.
Papiervorschub: 1 inch/5 Min.
Detektorempfindlichkeit: 3×10^{-8} mA und höher bei 500 V
Temperaturen: Einspritzblock: 230°C
Detektor: 210°C
Einspritzmengen: ca. 3 - 5 μl einer konzentrierten Lösung

a. Hydroxyfettsäuremethylester

- a) Säulenfüllmaterial: SE-30 3% (Silicon-Elastomer) auf Chromosorb
WAW 45 - 60 mesh
Säulentemperatur: 180°C Isotherm
- b) Säulenfüllmaterial: EGSS-X 10% (Polyäthylglycolsuccinat sil.)
auf Gaschrom P 80 - 100 mesh
Säulentemperatur: 190°C

b. Alditolacetate der partiell methylierten Zucker

- Säulenfüllmaterial: ECNSS-M 3% (Silicon Cyanoäthyl) auf Gaschrom Q
100 - 120 mesh
Säulentemperatur: 165°C Isotherm

2. Modell Perkin Elmer 900 mit einem Flammenionisationsdetektor
Säule: spiralig gebogene Glassäule 1.8 m/2 mm i. Ø
Trägergas: Spezial Argon der Fa. Linde, Reinheit 99.99%
Gasdurchfluß: 30 ml/Min.
Papiervorschub: 5 mm/Min.
Detektorabschwächung: Range 10, Att. 512 und geringer
Temperaturen:
Einspritzblock und Detektor je 250°C
Einspritzmengen: ca. 2 - 4 μl einer konzentrierten Lösung

a. Trimethylsilylzucker

Säulenfüllmaterial: SE-30 3% auf Chromosorb WAW 45 - 60 mesh

Säulentemperatur: 175° C Isotherm

b. Alditolacetate der partiell methylierten Zucker

Säulenfüllmaterial: ECNSS-M 3% auf Gaschrom Q 100 - 120 mesh

Säulentemperatur: 160° C Isotherm

c. Acetylzucker

Säulenfüllmaterial: EGSS-X 10% auf Gaschrom P 80 - 100 mesh

Säulentemperatur: 180° C (nach 12 Min. - 205° C programmiert
16° C/Min.

Säulenfüllmaterialien wurden hergestellt von Applied Science Lab.

(Fa. Serva, Heidelberg)

VII. Präparative Gaschromatographie

Mit Hilfe des Extracell-Zusatzes GC-1 (Fa. Beckman-RJJC Ltd., London) wurden unter den gaschromatographischen Bedingungen 10 - 100 µg gewünschte Substanz aus mehreren eingespritzten Proben aufgefangen. Als Auffanggefäß diente ein bei ca. -50° C gekühltes Schmelzpunktröhrchen, an das beidseitig PVC-Schläuchchen angefügt waren.

B. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Mikroanalysen

Die Bestimmungen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

Schmelzpunkte

Wir trockneten die Substanzen in der Trockenpistole über Diphosphorpentoxid und bestimmten den Schmelzintervall auf der Koflerheizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte aus einer Pyridinlösung im Dampfdruckosmometer Mechrolab Mosell 301 A (15 mg Glykosidsäureacetat).

UV-Spektren

Einzelmessungen wurden im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II in 1 cm Glasküvetten durchgeführt.

Spektren wurden mit einem Beckman DK-2 A Ratio Recording Spektrophotometer aufgenommen (10 - 200 μ g Zucker-Anthron).

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckman-Spektrophotometer IR-8 in KBr aufgenommen (1.0 - 1.5 mg Substanz).

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem Varian A-60 A aufgenommen (41 mg Substanz/0.4 ml CDCl_3).

Optische Drehung

Die Drehungen wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A₂) gemessen (20 mg Substanz).

Massen-Spektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT SM 1-A bei 70 eV und 300 μ A und einem AEI 30 bei 70 eV und 100 μ A aufgenommen.

Für die Ausführung der Mikroanalysen, IR-Spektren, NMR-Spektren, optischen Drehungen und Molekulargewichtsbestimmungen danke ich Herrn O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie München, bin ich für Aufnahme der Massenspektren und Mithilfe bei der Diskussion zu Dank verpflichtet.

C. Gewinnung der Glykosidsäure aus Convolvulus microphyllus (Microphyllinsäure)

I. Extraktion

100 g grobgepulvertes Kraut von Convolvulus microphyllus Sieb ex. Spreng. wurden 24 Stdn. am Soxhlet mit 500 ml Äther extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei 45° C bis zur Sirupdicke eingengt. Ausbeute: 3.2 g dunkelgrüner Extrakt.

II. Alkalische Hydrolyse

1. Katalytische Hydrolyse mit Natriummethylatlösung

Eine Lösung von 5,0 g Ätherextrakt in 20,0 ml Methanol p.A. ließen wir nach Behandlung mit einigen Tropfen 1 N-Natriummethylatlösung (pH 8 - 9) 12 Stdn. bei 4° C und anschließend 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach Ansäuern mit Essigsäure wurde die Lösung mit 100 ml Wasser verdünnt und dreimal mit 50 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen, die die kurzkettigen Fettsäuren enthalten, wurden am Rotationsverdampfer eingengt und gaschromatographisch auf kurzkettige Fettsäure untersucht. Die Methanol-Wasser-Phase wurde zur Trockene eingengt, in einigen ml Wasser aufgenommen und mit einem Überschuß an Aceton versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde bei 5000 U/Min. abzentrifugiert. Nach dem Trocknen erhielten wir ein gelbliches Pulver, das den Glykosidsäuremethylester und viele andere lipophile Substanzen aufwies.

Ausbeute: 1,2 g.

2. Natriumhydroxyhydrolyse

1,0 g Ätherextrakt wurde in 20,0 ml 0,5 N-Natriumhydroxydlösung (50% methanolisch) über Nacht stehen gelassen und dann 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Ansäuern wurde die Lösung mit Äther ausgeschüttelt und - wie unter C/II/1 beschrieben - mit Aceton gefällt.

III. Acetylierung

5.0 g Glykosidsäuremethylestergemisch wurden in 50 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von 50 ml Essigsäureanhydrid 15 Min. am siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend blieb die Lösung über Nacht stehen. Das Reaktionsgemisch wurde unter kräftigem Umrühren am Magnetrührer in 1 l Eiswasser gegossen und das ausgefallene Acetat abgenutscht.

Ausbeute: 200 mg einer weißen amorphen Substanz.

IV. Isolierung des Glykosidsäuremethylesters

5.0 g des Gemisches von Glykosidsäuremethylestern und anderen Lipiden wurden in Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) aufgenommen und vorsichtig auf eine Kieselgelsäule aufgetragen.

Säulenhöhe: 80 cm

Säulen-Ø : 6,0 cm

Adsorbens: Kieselgel 0,05 - 0,2 mm

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Es wurden Fraktionen zu 20,0 ml aufgefangen und nach dünnsschichtchromatographischer Überprüfung entsprechend vereinigt. Die Hauptmenge des Methyl-esters wurde aus Fraktionen 80 - 120 als hellgelbes Pulver erhalten.

V. Isolierung des Glykosidsäureacetats (Microphyllinsäureacetat)

500 mg des fast reinen Glykosidsäuremethylesters von C/IV wurden acetyliert (siehe C/III) und in ca. 5 ml Benzol-Aceton (1:1) aufgenommen und vorsichtig auf eine Kieselgelsäule aufgetragen.

Säulenhöhe: 40 cm

Säulen-Ø : 3 cm

Adsorbens: Kieselgel 0,05 - 0,2 mm

Laufmittel: Benzol-Aceton (1:1)

Tropfgeschwindigkeit: 12 Tropfen/Min.

Es wurden Fraktionen zu 20,0 ml aufgefangen und nach dünn-schichtchromatographischer Überprüfung entsprechend vereinigt. Die Hauptmenge des Acetats wurde aus den Fraktionen (40 - 60) als weißes Pulver erhalten.

Schmp. $76 - 78^{\circ}\text{C}$ $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -44.2^{\circ}$ ($c = 0.9597$ in Chloroform)

$\text{C}_{71}\text{H}_{110}\text{O}_{36}$ M.G. 1538 Ber. C 55.39 H 7.15

$12 \text{ CH}_3\text{CO}$ (32.4%) Gef. C 55.60 H 6.76

IR (in KBr): $\text{CO } 1720 \text{ cm}^{-1}$

VI. Entacetylierung des Acetats

100 mg Acetat wurden in 10 ml Methanol p.A. gelöst, einige Tropfen 1 N-Natriummethylatlösung zugesetzt und wie unter C/II/1 behandelt. Auf diese Weise wurden 60 mg Glykosidsäuremethylester erhalten.

Schmp. $193 - 195^{\circ}\text{C}$ $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -62.9^{\circ}$ ($c = 0.873$ in Wasser)

$\text{C}_{47}\text{H}_{86}\text{O}_{24}$ M.G. 1034 Ber. C 54.64 H 8.31

Gef. C 51.2 H 7.29

IR (in KBr): $\text{CO } 1700 \text{ cm}^{-1}$; $\text{OH } 3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$

DC: Kieselgel/Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) $R_f = 0.40$

D. Strukturaufklärung der Microphyllinsäure

I. Hydrolysen

1. Hydrolyse der Glykosidsäuremethylester

50 mg Substanz wurden mit 2.0 ml 1 N-Schwefelsäure 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde dreimal mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde dreimal mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, eingeengt und für die Fettsäureanalyse verwendet. Die vom Aglykon befreite wässrige Zuckerlösung wurde mit

feingepulvertem Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und nach dem Einengen auf 2 ml dünn- und papierchromatographisch untersucht.

2. Hydrolyse des Acetats

50 mg Acetat wurden mit 2.0 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure unter Rückfluß erhitzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach D/I/1.

II. Darstellung der Fettsäuremethylester

Die Chloroformlösung nach D/I/1, die die Fettsäure enthielt, wurde methyliert. Diazomethan wurde aus 1.5 g N-Methyl-N-Nitroso-p-toluolsulfonamid in 3.0 ml Äther, 3.0 ml 60%ige Kaliumhydroxydlösung und 5.0 ml Carbitol (Glykol-Mono-äthyläther) hergestellt und mit Hilfe von Stickstoff in die in Äther gelöste Fettsäure eingeleitet. Das Ende der Methylierung ist an der Gelbfärbung, die durch überschüssiges Diazomethan verursacht wird, sichtbar. Die Ätherlösung wurde zur Trockene eingengt, die Fettsäuremethylester in Chloroform p.A. aufgenommen und dünn- und papierchromatographisch untersucht. Der Fettsäuremethylester (5 mg in 1 ml Chloroform) wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie über 12 x 20 cm Kieselgel-Pyranin-Platten (4 mm Schichtdicke) im Laufmittel Äther-Petroläther (3:7) gereinigt und bei tiefer Temperatur aus Äther-Hexan (1:1) kristallisiert. Nach zweimaligem Umkristallisieren betrug der Schmelzpunkt $43 - 44^{\circ}\text{C}$. Ausbeute: ca. 5.0 mg.

$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_3$ Massenspektrometrie: M^+ (286);

Hauptpeaks: m/e - 55, 89, 143, 183, 186, 215

IR (in KBr): CO 1760 cm^{-1} ; OH 3420 cm^{-1} (siehe Abb. S. 21)

NMR: (TMS int.) $-\text{CH}_3$ $\delta = 0.89$ (t, $J = 5.0\text{ Hz}$) 3 H; CH_2 $\delta = 1.32$ (s, br) 24 H; OH $\delta = 1.52$ (s) 1 H; $-\text{CH}_2$ $\delta = 2.29$ (t, $J = 7.0\text{ Hz}$) 2 H; $-\text{OC}_{11}\text{H}$ $\delta = 3.56$ (s, br) 1 H; OCH_3 $\delta = 3.63$ (s) 3 H.

III. Quantitative Bestimmung der Zucker der Microphyllinsäure

1. Gaschromatographische Untersuchungen

10 mg Glykosidsäuremethylester wurden mit 1 N- H_2SO_4 wie üblich hydrolysiert, neutralisiert und mit Chloroform dreimal ausgeschüttelt. Die erhaltenen Monosaccharide wurden in 5.0 ml Wasser mit 10.0 mg Natriumborhydrid im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stdn. lang stehen gelassen. Dann wurde die Lösung mit einigen Tropfen Essigsäure neutralisiert und zur Trockene eingengt. Die Probe wurde mit je 3.0 ml Methanol p.A. versetzt und der gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Diesen Vorgang wiederholten wir viermal, um die Borsäure quantitativ zu entfernen. Die Alditole wurden in 1.0 ml Pyridin (über KOH-Plätzchen getrocknet) gelöst. 0.5 ml wurden für Silylierung aufgehoben.

a. Acetylierung

Zu den in 0.5 ml Pyridin gelösten Alditolen wurden noch 0.5 ml Pyridin zugesetzt. Dann wurde 1.0 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt und das Kölbchen 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 15 ml Wasser verdünnt und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 5.0 ml Chloroform aufgenommen, mit 5.0 ml Wasser dreimal gewaschen, die Chloroformlösung mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Die erhaltenen Alditolacetate wurden in 0.2 ml Chloroform p.A. aufgenommen und nach A/VI/4 gaschromatographiert.

b. Silylierung

Für die Silylierung von D/III/1 wurden zu dem in 0.5 ml Pyridin gelösten Alditol noch 0.5 ml trockenes Pyridin zugesetzt. Dann wurden 0.2 ml Hexamethyldisilazane und 0.1 ml Trimethylchlorosilane zugegeben, das Ganze 30 Sek. kräftig geschüttelt und dann 5 Min. stehen gelassen. Die Reaktion wurde in einem Fläschchen mit Plastikverschluß durchgeführt und nach A/VI/3 gaschromatographiert.

IV. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker

1. Herstellung der Zuckerlösungen

11.825 mg Zucker der Microphyllinsäure von D/I/1, genau geworden, wurden in 5.0 ml Wasser gelöst. 0.04 ml, 0.07 ml und 0.10 ml dieser Zuckermischung wurden auf eine Kieselgel-Fertigplatte (ohne Fluoreszenzindikator) aufgetragen. Als Standardzuckerlösungen dienten Lösungen von 60.94 mg Glucose-Monohydrat, 55.5 mg Rhamnose-Monohydrat und 27.75 mg Fucose-Monohydrat in 50.0 ml Wasser. Diese Lösung entspricht einem Mol-Verhältnis von Glucose-Rhamnose-Fucose wie 2:2:1. 0.04, 0.07 und 0.10 ml dieser Lösung wurden in der Mitte derselben Platte, 0.1 ml zusätzlich an beiden Rändern der Platte aufgetragen. Nach der Entwicklung der Platte mit Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2) wurden die Ränder abgeschnitten und mit 50%iger Schwefelsäure besprüht, um die R_f -Werte der Zuckerflecke festzustellen. Jeder Zuckerfleck wurde von der Platte sorgfältig abgekratzt. In jedem Fall wurde der Platte eine gleiche Menge Kieselgel entnommen und in die Reagenzgläser gegeben. Eine gleiche Menge Kieselgel ohne Zucker wurde auch entnommen und als ein Blindwert verwendet.

2. Anthron-Bestimmung

Jede Kieselgel-Zucker-Mischung wurde mit 1.0 ml Wasser versetzt und auf dem "Whirlymixer" kräftig geschüttelt. Diese Lösungen wurden in einem Eisbad mit 2.0 ml (0.2%ige Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure) versetzt, wieder kräftig geschüttelt und 16 Min. in siedendem Wasser erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Lösungen in 1 cm Küvetten dekantiert und bei 625 nm im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II gegen eine Blindlösung gemessen.

Tabelle 4

Quantitative Zuckerbestimmung der Microphyllinsäure

<u>Glucose</u>			<u>Glykosidsäure</u>		
<u>Testlösung</u>					
<u>ml</u>	<u>µg</u>	<u>E</u>	<u>ml</u>	<u>E</u>	<u>gef. (µg)</u>
0.04	48.8	.631	0.04	.262	18.0
0.07	85.4	1.07	0.07	.381	28.0
0.10	122.0	1.32	0.10	.488	37.0
<u>Fucose</u>					
0.04	22.2	.141	0.04	.090	17.0
0.07	38.8	.270	0.07	.220	29.0
0.10	55.5	.470	0.10	.305	38.0
<u>Rhamnose</u>					
0.04	44.4	--	0.04	.390	46.0
0.07	77.7	.725	0.07	.800	86.0
0.10	111.1	1.05	0.10	1.10	115.0

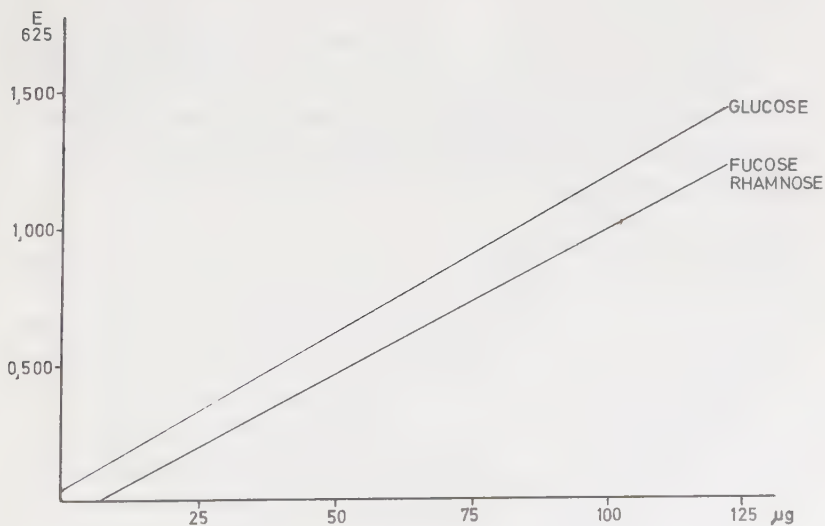


Abb. 22

Eichgerade von Glucose, Fucose und Rhamnose nach der Anthron-Methode

V. Partielle Hydrolyse

50 mg Glykosidsäuremethylester wurde mit 70%iger Ameisensäure versetzt und 30 Min. bei 90° C in einem Wasserbad erhitzt. Die Reaktionsprodukte wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, in Methanol p.A. aufgenommen und mit Diazomethan (CH_2N_2) wie unter D/II methyliert. Die partiell hydrolysierten Glykosidsäuremethylester wurden dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase) auf Kieselgel-Fertigplatten der Fa. Merck untersucht und schließlich präparativ getrennt. Das Gemisch wurde in 1 ml Chloroform gelöst und strichförmig auf die Platte aufgetragen. Die R_f -Werte der Produkte wurden durch Besprühen der Ränder mit H_2SO_4 ermittelt.

VI. Acetolyse

100 mg Glykosidsäureacetat wurden in 8 ml Essigsäureanhydrid gelöst und unter stetigem Umrühren und Eiskühlung tropfenweise 0,25 ml konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt. Anschließend rührten wir eine halbe Stunde bei Eiskühlung und 12 Stdn. bei Raumtemperatur.

Das Reaktionsprodukt wurde auf 200 ml Eiswasser gegossen und fünfmal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung und dreimal mit 100 ml Wasser gewaschen. Die mit Na_2SO_4 getrocknete Chloroform-Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

1. Trennung der Oligosaccharidacetate

Die Trennung der gebildeten Acetate wurde mit Hilfe von Merck-Fertigplatten Kieselgel 60 HF-254 durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Benzol-Äthylacetat (5:4) durchgeführt. Eine grobe Trennung der Oligosaccharidacetate von den Monosaccharidacetaten konnte erreicht werden. Die Acetate wurden in 2 ml Chloroform gelöst und strichförmig auf der Platte aufgetragen, entwickelt und die Oligosaccharidacetatmischung von der Platte abgekratzt. Die Acetate wurden aus dem Kieselgel mit Chloroform extrahiert und eingengt. Ausbeute: 50 mg.

Die Acetatmischung wurde dann in 10.0 ml Methanol p.A. gelöst und 0.1 ml 1 N-Natriummethylatlösung zugesetzt. Nach Stehenlassen über Nacht bei 4° C wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Äther gefällt. Die freien Zucker wurden nach A/IV papierchromatographisch untersucht. Wir fanden neben Rhamnose zwei Zuckerflecke. Die Oligosaccharide wurden nach A/V durch präparative Papierchromatographie gewonnen. Ausbeute: je 10.0 mg.

VII. Perjodat-Oxidation

10.0 mg Substanz (Zucker oder Glykosidsäuremethylester) wurden in 2.0 ml Wasser gelöst, auf 5° C abgekühlt und anschließend 50.0 mg Natrium-meta-perjodat in 2.0 ml Wasser zugesetzt. Diese Lösung wurde 4 Stdn. bei 5° C aufbewahrt, anschließend mit 4.0 ml Natriumborhydridlösung (5 mg/ml) versetzt und diese Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde mit Essigsäure neutralisiert, zur Trockene eingengt und mit 1 N-Schwefelsäure hydrolysiert. Die mit Bariumcarbonat neutralisierte Lösung wurde dünnstschichtchromatographisch im Laufmittel Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) untersucht.

VIII. Permethylierung

1. 60 mg Microphyllinsäuremethylester wurden in 5 ml frisch destilliertem N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und tropfenweise 1.0 ml Methyljodid sowie 1.0 g Silberoxyd portionsweise zugesetzt, wobei dafür gesorgt wurde, daß die Lösung nicht über 30° C stieg. Der Glykosidsäuremethylester wurde unter kräftigem Umrühren 48 Stdn. methyliert.

Die nun gelbe Suspension wurde mit 200 ml Chloroform verdünnt, wobei das Silberjodid ausfiel. Die Suspension wurde filtriert, die Chloroformlösung dreimal mit Wasser und zweimal mit 2%iger Kaliumcyanatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und schließlich eingengt. Chromatographisch waren in dem Methylierungsprodukt mehrere Flecken nachweisbar. 40 mg dieses Produkts wurden in 2.0 ml Chloroform aufgenommen, auf Kieselgel-Platten aufgetragen und im Laufmittel Benzol-Methanol (9:1) präparativ getrennt. Es wurden 20 mg eines reinen Permethyläthers erhalten.

2. 10.0 mg Microphyllinsäure oder Acetat wurden in 1.0 ml frisch destilliertem DMF gelöst, 2 - 3 mg Natriumhydrid zugesetzt und das Ganze 10 Min. im Dunkeln stehen gelassen. Dann wurden 2.0 ml Methyljodid zugesetzt. Nach 1 Stde. wurde der Überschuß von CH_3J am Rotationsverdampfer entfernt, die Lösung in Wasser aufgenommen und mit Äther ausgeschüttelt. Diese Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockene eingengt.

IX. Hydrolyse der Methylzucker

20 mg des gereinigten Permethyläthers wurden in 5 ml 1%ige wässrige Schwefelsäure 4 Stdn. am Rückflußkühler hydrolysiert. Die erkaltete Lösung wurde mit feingepulvertem Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und zur Trockene eingengt. Die Methylzucker wurden dünnschicht-, papier- und gaschromatographisch untersucht.

X. Darstellung der Methylzuckeralditolacetate

1. Reduktion mit Natriumborhydrid

1 mg partiell methylierter Zucker wurde in 5 ml Wasser mit 10 mg Natriumborhydrid im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stdn. stehen gelassen. Dann wurden die Na^+ -Ionen durch spatelweise Zugabe von Dowex 50 (H^+ -Form) und kräftigem Mischen am Whirlimix entfernt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingengt.

2. Entfernung der Borsäure

Die Probe wurde mit je 3 ml Methanol versetzt und der gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Diesen Vorgang wiederholten wir viermal, um die Borsäure quantitativ zu entfernen, da Reste von Borsäure die nachfolgende Acetylierung stören würden.

3. Acetylierung

Das reduzierte Methylzuckeralditolacetat wurde in 2 ml Pyridin gelöst und mit 2 ml Essigsäureanhydrid p.A. in einem Schliffkölbchen versetzt. Das Kölbchen wurde 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 5 ml Wasser verdünnt und im Vakuum zur Trockene ein-

geengt, bis der Rückstand nicht mehr nach Pyridin oder Essigsäure roch. Der Rückstand wurde in 10 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die Chloroformlösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und schließlich eingeengt. Der Rückstand wurde in 0.2 ml Chloroform p.A. aufgenommen und gaschromatographisch untersucht.

E. Beiträge zur Struktur einer Glykosidsäure aus Ipomoea Quamoclit L.

(Quamoclitsäure)

Alle Isolierungs- und Aufarbeitungsverfahren sind mit der der Microphyllinsäure identisch mit Ausnahme der folgenden:

I. Extraktion

5 kg grobgepulverte Wurzeln von Ipomoea Quamoclit L. wurden mit 2 l Äther 24 Stdn. im Soxhlet extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei 45°C bis zur Sirupdicke eingeengt. Ausbeute: 1.3 kg.

Aus 200,0 g Ätherextrakt wurden nach alkalischer Hydrolyse, Säulenchromatographie, Acetylierung und Säulenchromatographie des Acetats 700 mg reines Glykosidsäureacetat erhalten.

Schmp. $81 - 83^\circ\text{C}$ $[\alpha]_D^{24} = -45.9^\circ$ ($c = 1.1336$ in Chloroform)

$\text{C}_{69}\text{H}_{106}\text{O}_{32}$ M.G. 1478 Ber. C 56.02 H 7.01

11 CH_3CO (31.8%) Gef. C 56.25 H 6.80

IR (in KBr): $\text{CO } 1720\text{ cm}^{-1}$

Quamoclitsäuremethylester

Schmp. $129 - 131^\circ\text{C}$ $[\alpha]_D^{22} = -67.6^\circ$ ($c = 0.9283$ in Wasser)

$\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{O}_{23}$ M.G. 1016 Ber. C 55.51 H 8.26

Gef. C 50.25 H 7.15

DC: Kieselgel/Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) $R_f = 0.60$

IR (in KBr): $\text{CO } 1700\text{ cm}^{-1}$ $\text{OH } 3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$

II. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker

Um eine bessere Trennung der Monosaccharide zu erreichen, wurden Pufferplatten wie unter A/I/1 und das Laufmittel Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) verwendet. Standard-Zuckerlösung: 111,0 mg Rhamnose-Monohydrat und 33,3 mg Fucose in 50,0 ml Wasser. Diese Lösung entspricht einem Mol-Verhältnis von Rhamnose zu Fucose wie 3:1. 30,0 mg Zucker der Quamoclitssäure wurden in 5,0 ml Wasser gelöst, 0,03 ml, 0,04 ml und 0,05 ml Testlösung sowie 0,01 ml, 0,02 ml und 0,03 ml Zuckermischung der Glykosidsäure wurden auf einer Platte entwickelt und nach D/IV/2 aufgearbeitet.

Tabelle 5

Quantitative Zuckerbestimmung der Quamoclitssäure

<u>Rhamnose</u>			<u>Glykosidsäure</u>		
<u>Testlösung</u>					
<u>ml</u>	<u>µg</u>	<u>E</u>	<u>ml</u>	<u>E</u>	<u>gef. (µg)</u>
0,03	60,0	,645	0,01	,525	52,0
0,04	80,0	,800	0,02	1,21	120,0
0,05	100,0	,965	0,03	1,67	165,0
<u>Fucose</u>					
0,03	20,0	,215	0,01	,133	13,0
0,04	26,66	,255	0,02	,285	29,0
0,05	33,3	,305	0,03	,385	39,0

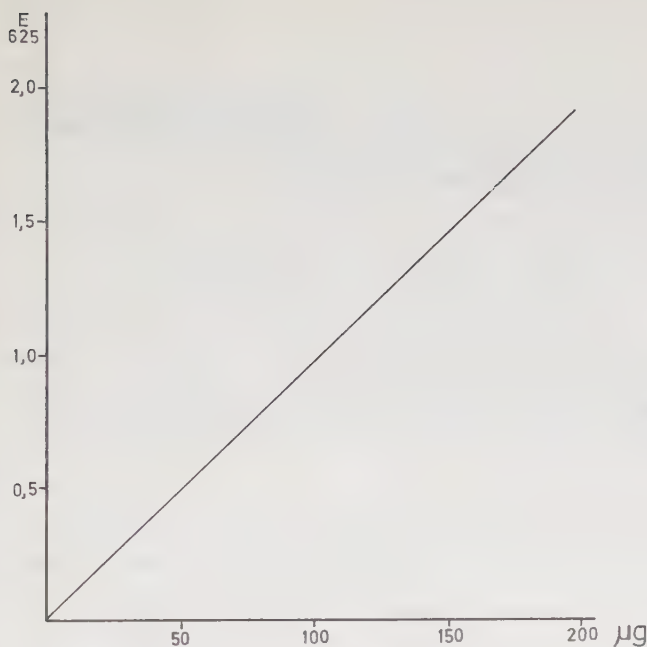


Abb. 23

Eichgerade von Rhamnose und Fucose nach der Anthron-Methode

F. Versuche zur Strukturaufklärung einer Glykosidsäure aus *Ipomoea orizabensis*

(Pellet) Ledanois

Alle Isolierungs- und Aufarbeitungsverfahren sind mit der der Microphyllinsäure identisch mit Ausnahme der folgenden:

I. Extraktion

600 g Harz wurden zunächst 24 Stdn. mit 500 ml Petroläther und anschließend genau solange mit der gleichen Menge Äther im Soxhlet extrahiert. Der filtrier- te Ätherextrakt wurde bei 45° C am Rotationsverdampfer bis zur Sirupdicke eingeengt.

Ausbeute: 65,5 g.

II. Isolierung

5.4 g Glykosidsäureacetatmischung wurden in Benzol-Aceton (1:1) aufgenommen und an einer Kieselgelsäule chromatographiert.

Säulenhöhe: 80 cm
 Säulen-Ø : 6.0 cm
 Adsorbens: Kieselgel 0.05 - 0.2 mm
 Laufmittel: Benzol-Aceton (1:1)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Es wurden Fraktionen zu 20.0 ml aufgefangen und nach dünnsschichtchromatographischer Überprüfung die Fraktionen 80 - 100 vereinigt.

Ausbeute: 3.2 g.

Davon wurden 2.0 g Glykosidsäuremethylester strichförmig auf Kieselgel HF₂₅₄-Fertigplatten aufgetragen, im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) entwickelt und im UV-Licht betrachtet. Die fluoreszierende Zone (R_f - 0.55) wurde mit einer Präpariernadel markiert, ausgeschabt und dreimal 20 Min. mit Chloroform p.a. durch Rühren am Magnetrührer extrahiert. Ausbeute: 1.2 g.

Glykosidsäuremethylester

Schmp. 112 - 114° C $[\alpha]_D^{22} = -46.05^\circ$ (c = 0.9549 in Wasser)

$C_{41}H_{74}O_{20}$	M.G. 886	Ber. C 55.53	H 8.35
		Gef. C 50.4	H 7.19

DC: Kieselgel/Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) $R_f = 0.55$

IR (in KBr): CO 1700 cm⁻¹ OH 3200 - 3500 cm⁻¹

Die durch Verseifen erhaltene freie Glykosidsäure wurde in üblicher Weise acetyliert.

Schmp. 69 - 71° C $[\alpha]_D^{24} = -10.3^\circ$ (c = 1.0326 in Chloroform)

$C_{61}H_{94}O_{32}$	MG 1302	Ber. C 56.04	H 7.19
$10CH_3CO$ (32.1%)		Gef. C 56.62	H 6.97

IR (in KBr): CO 1720 cm⁻¹

III. Spektralphotometrische Bestimmung der Zucker

122,0 mg Glucose-Monohydrat und 111,0 mg Rhamnose-Monohydrat wurden in 50,0 ml Wasser gelöst. Diese Lösung entspricht einem Mol-Verhältnis von Methylpentose zu Hexose (1:1). 20,0 mg Zucker der Glykosidsäure wurden in 5,0 ml Wasser gelöst. 0,03 ml, 0,04 ml und 0,05 ml Testlösung sowie 0,01 ml, 0,02 ml und 0,03 ml Zuckermischung der Glykosidsäure wurden auf einer Platte entwickelt und nach D/IV/2 aufgearbeitet. Es wurden Pufferplatten wie unter A/I/1 und das Laufmittel Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1) verwendet.

Tabelle 6

Quantitative Zuckerbestimmung der Orizabinsäure β

<u>Glucose</u>			<u>Glykosidsäure</u>		
<u>Testlösung</u>					
<u>ml</u>	<u>μg</u>	<u>E</u>	<u>ml</u>	<u>E</u>	<u>gef. (μg)</u>
0.03	73.0	.800	0.01	.126	12.0
0.04	97.0	1.065	0.02	.212	20.0
0.05	122.0	1.300	0.03	.316	29.0
<u>Rhamnose</u>					
0.03	67.0	.392	0.01	.060	11.0
0.04	97.0	.540	0.02	.120	21.0
0.05	111.0	.610	0.03	.180	32.0
<u>Chinovose</u>					
			0.01	.120	21.0
			0.02	.220	40.0
			0.03	.325	59.0

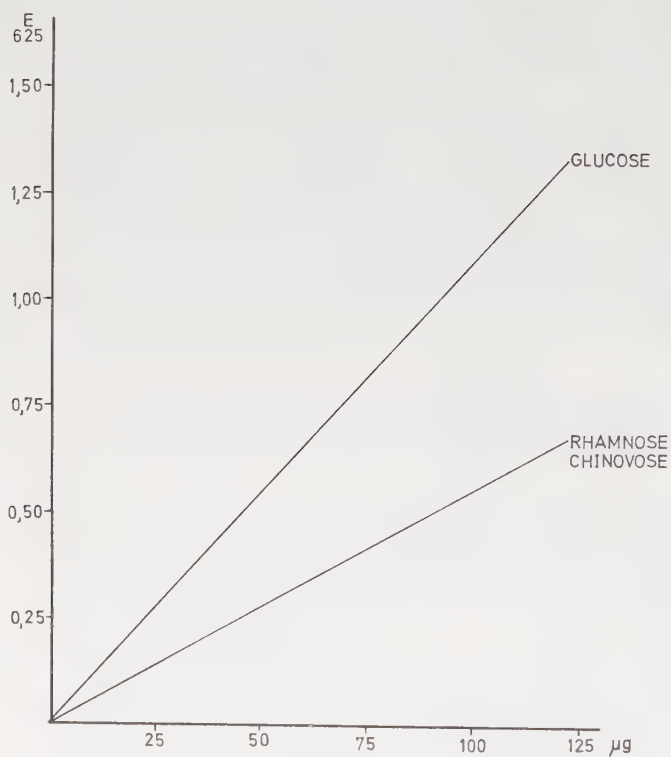


Abb. 24

Eichgerade von Glucose, Rhamnose und Chinovose nach der Anthron-Methode

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) R. HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen III, Birkhäuser, Basel und Stuttgart, S. 547 (1964)
- 2) C. MANNICH u. P. SCHUMANN, Arch. Pharm. 276/48, 211 (1938)
- 3) E. GRAF, E. DAHLKE u. H.W. VOIGTLÄNDER, Arch. Pharm. 298, 81 (1965)
- 4) N. KROMER, Arch. Pharm. 239, 373, 384 u. 389 (1901)
- 5) HOEHNEL, Arch. Pharm. 234, 647 (1898)
- 6) E. VOTOCEK u. F. VALENTIN, Collect. Trav. Chim. Tchechoslovaquie 1, 47 (1929)
- 7) E. VOTOCEK u. V. PRELOG, Collect. Trav. Chim. Tchechoslovaquie 1, 55 (1929)
- 8) K.H. BAUER u. R. JUNGE, Arch. Pharm. 271/44, 841 (1934)
- 9) R. JARETZKY u. E. RISSE, Arch. Pharm. 287, 379 (1940)
- 10) E.J. SHELLARD, Planta Med. 9, 102, 141 u. 146 (1961)
- 11) H. AUTERHOFF u. H. DEMLEITNER, Arzneimittel-Forsch. 5, 402 (1955)
- 12) C.R. SMITH, L.H. NIECE, H.F. ZOBEL u. I.A. WOLFF, Phytochemistry 3, 289 (1963)
- 13) G. LEGLER, Phytochemistry 4, 29 (1965)
- 14) H. OKABE u. T. KAWASAKI, Tetrahedron Letters 36, 3123 (1970)
- 15) T. KAWASAKI, H. OKABE u. I. NAKATSUKA, Chem. Pharm. Bull. 19, 1144 (1971)
- 16) H. OKABE, N. KOSHITO, K. TANAKA u. T. KAWASAKI, Chem. Pharm. Bull. 19, 2394 (1971)
- 17) H. OKABE u. T. KAWASAKI, Chem. Pharm. Bull. 20, 514 (1972)
- 18) H. WAGNER u. P. KAZMAIER, Tetrahedron Letters 35, 3233 (1971)
- 19) S. SINGH u. B.E. STACEY, Phytochemistry 12, 1701 (1973)
- 20) J.P.S. SARIN, H.S. GARG, N.M. KHANNA u. M.M. DHAR, Phytochemistry 12, 2461 (1973)
- 21) T. COOKE, The Flora of the Presidency of Bombay, Taylor and Francis, London, S. 229 (1908)
- 22) G.K. KARANDIKAR u. S. SATAKOPAN, Indian J. Pharm. 21, 204 (1959)
- 23) G.K. KARANDIKAR u. S. SATAKOPAN, Indian J. Pharm. 21, 200 (1959)
- 24) H. WAGNER, L. HÖRHAMMER u. P. WOLFF, Biochem. Z. 334, 175 (1961)
- 25) P. KAZMAIER, Dissertation München
- 26) P. POHL, H. GLASL u. H. WAGNER, J. Chromatography 42, 75 (1969)
- 27) H.K. MANGOLD, J. Oil Chemist's Soc. 38, 708 (1961)
- 28) R.T. O'CONNOR, C.H. MACK, E.F. DUPRE u. W.G. BICKFORD, J. Org. Chem. 18, 693 (1953)
- 29) R.T. O'CONNOR, Fatty Acids, Klare S. Markley (Editor), Interscience Publishers, New York, S. 427 ()
- 30) C.Y. HOPKINS u. H.J. BERNSTEIN, Can. J. Chem. 37, 775 (1959)
- 31) C.Y. HOPKINS, Progr. Chem. Fats Other Lipids 8, 215 (1966)
- 32) C.Y. HOPKINS, J. Amer. Oil Chem. Soc. 38, 664 (1961)
- 33) R. RYHAGE u. E. STENHAGEN, Ark. Kemi. 15, 545 (1960)
- 34) J.A. McCLOSKEY in Topics in Lipid Chemistry Vol. I, F.D. Gunstone Editor, Logos Press, London, S. 369 (1970)

- 35) R. RYHAGE u. E. STENHAGEN, Ark. Kemi. 13, 523 (1959)
- 36) F.W. McLAFFERTY, Anal. Chem. 31, 82 (1959)
- 37) DINH-NGUYEN, N. RYHAGE, S. STÄLLBERG-STENHAGEN u. E. STENHAGEN, Ark. Kemi. 18, 393 (1961)
- 38) S.M. PATRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)
- 39) W. KLYNE, Biochem. J. 47 (1950)
- 40) M.T. KRAUSS, H. JÄGER, O. SCHINDLER u. T. REICHSTEIN, J. Chromatography 3, 63 (1960)
- 41) C.C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA u. W.W. WELLS, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963)
- 42) F. BANDOW, Biochem. Z. 294, 124 (1937)
- 43) Z. DISCHE in Methods in Biochemical Analysis, D. Glick, Editor, Vol. II, Interscience Publishers, New York, S. 323 (1955)
- 44) Z. DISCHE u. A. DANILCHENKO, Analytical Biochemistry 21, 119 (1967)
- 45) R. DREYWOOD, Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed. 18, 795 (1938)
- 46) MALLOV, J. Biol. Chem. 201, 825 (1953)
- 47) I. DANISHEFSKY, R.L. WHISTLER u. F.A. BETTELHEIM, The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry Vol. II A, Editors W. Pigman u. D. Horton, S. 401 (1970)
- 48) M.L. WOLFROM, E.N. LASSETRE u. A.N. O'NEILL, J. Amer. Chem. Soc. 73, 595 (1951)
- 49) G.O. ASPINALL, The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry, Vol. II B, Editors W. Pigman u. D. Horton, S. 522 (1970)
- 50) H. HEBBERT u. E.G.V. PERCIVAL, J. Amer. Chem. Soc. 52, 3995 (1930)
- 51) G.O. ASPINALL u. R. YOUNG, J. Chem. Soc. 3003 (1965)
- 52) G.O. ASPINALL u. J. BAILLIE, J. Chem. Soc. 1702 (1963)
- 53) G.O. ASPINALL u. J. BAILLIE, J. Chem. Soc. 1714 (1963)
- 54) G.O. ASPINALL, A.J. CHARLSON, E.L. HIRST u. R. YOUNG, J. Chem. Soc. 1696 (1963)
- 55) A. THOMPSON, M.L. WOLFROM u. E.J. QUINN, J. Amer. Chem. Soc. 75, 3003 (1953)
- 56) SUTHERLAND, Biochem. J. 115, 935 (1969)
- 57) M.H. SAIER u. C.E. BALLOU, J. Biol. Chem. 243, 992 (1968)
- 58) G.W. HAY, B.A. LEWIS u. F. SMITH, Methods in Carbohydrate Chemistry V, R.L. Whistler Editor, Academic Press, New York, S. 381 (1965)
- 59) T. PURDIE u. J.C. IRVINE, J. Chem. Soc. 83, 1021 (1903)
- 60) W.N. HAWORTH, J. Chem. Soc. 107, 13 (1915)
- 61) W.S. DENHAM u. H. WOODHOUSE, J. Chem. Soc. 103, 1735 (1913)
- 62) C.M. FEAR u. R.C. MENZIES, J. Chem. Soc. 937 (1926)
- 63) I.E. MUSKAT, J. Amer. Chem. Soc. 56, 693 (1934)
- 64) R. KUHN, H. TRISCHMANN u. LÖW, Angew. Chem. 67, 32 (1955)
- 65) R. KUHN, H.H. BAER u. A. SEELIGER, Ann., 611, 236 (1958)
- 66) B. FLAHERTY, W.G. OVEREND u. N.R. WILLIAMS, J. Chem. Soc. 399 (1966)
- 67) S. HAKOMORI, J. Biochem. 55, 205 (1964)
- 68) E.J. COREY u. M. CHAYKOVSKY, J. Amer. Chem. Soc. 84, 866 (1962)

- 69) P.J. GAREGG u. B. LINDBERG, Acta Chem.Scand. 14, 871 (1960)
- 70) H. KILIANA, Chem.Ber. 63, 2866 (1930)
- 71) V. HARIHARAN u. S. RANGASWAMI, Phytochemistry 9, 409 (1970)
- 72) H.O. BOUVENG u. B. LINDBERG, Advan.Carbohyd.Chem. 15, 53 (1960)
- 73) F. BROWN, E.L. HIRST, L. HOUGH, J.K.N. JONES u. H. WAD MEN, Nature 161, 720 (1948)
- 74) E.L. HIRST u. J.K.N. JONES, J.Chem.Soc. 1659 (1949)
- 75) G.W. HAY, B.A. LEWIS u. F. SMITH, J.Chromatography 11, 479 (1963)
- 76) R. TSCHESCHE u. G. BALLE, Tetrahedron Letters 19, 2323 (1963)
- 77) G. AURNHAMMER, Dissertation München (1968)
- 78) A. McINNES, D. BALL, F. COOPER u. C. BISHOP, J.Chromatography 1, 556 (1960)
- 79) H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG u. S. SVENSSON, Acta Chem.Scand. 21, 1801 (1967)
- 80) J.S. SAWARDEKER, J.H. SLONEKER u. A. JEANS, Anal.Chem. 12, 1602 (1965)
- 81) H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG u. S. SVENSSON, Carbohydrate Res. 5, 43 (1967)
- 82) H. BJÖRNDAL, C.G. HELLERQUIST, B. LINDBERG u. S. SVENSSON, Angew.Chem. 82, 643 (1970)
- 83) K.R. KIRTIKAR u. B.D. BASU, Indian Medicinal Plants, Panini Office, Allahabad, Vol. II, S. 886 (1918)
- 84) S. SINGH u. B.E. STACEY, Analyst. 97, 977 (1972)
- 85) N. KROMER, J.Prakt.Chem. 57, 448 (1898)
- 86) F.B. POWER u. H. ROGERSON, J.Chem.Soc. (Trans.) 101, 1 (1912)
- 87) M. SAMUELSON, Chem.Ztg. 1543 (1884)
- 88) S. ASAHINA, J.Pharmaceut.Soc.Japan 523 u. 779 (1925)
- 89) S.N. KHANNA u. P.C. GUPTA, Phytochemistry 6, 753 (1967)
- 90) A. LIPTAK, P. KAZMAIER u. H. WAGNER, Chem.Ber. in Vorbereitung
- 91) A. LIPTAK, unveröffentlicht
- 92) T. KAWASAKI, private Mitteilung

Lebenslauf

Am 18. Juni 1946 wurde ich, Gerald Swarting, als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Arthur Swarting und seiner Ehefrau Roberta, geb. Mitchell, in Lincoln, Nebraska U.S.A. geboren. 1951 kam ich nach Storrs, Connecticut U.S.A. Im September 1952 trat ich dort in die Volksschule ein. Nach sechs Jahren Volksschule besuchte ich von 1958 bis 1964 die Edwin O. Smith High School in Storrs.

Im Wintersemester 1964/65 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Universität Connecticut in Storrs auf, das ich im Juni 1969 mit dem Staatsexamen abschloß. Von Juni bis Dezember 1969 war ich als Kandidat der Pharmazie in der "Gilbert Pharmacy" in Darien tätig. Von Januar bis September 1970 arbeitete ich in der "Flexer Pharmacy" in New Haven.

Seit September 1970 bin ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit vorliegender Arbeit beschäftigt.

Am 26. Dezember 1970 heiratete ich meine Frau Kathie, geb. Huntoon.

